

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD QUERÉTARO

**Encapsulación de antocianinas de maíz pigmentado usando
almidones modificados como material de pared**

Tesis que presenta:

M.C. Yunia Verónica García Tejeda

para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

en la Especialidad de Materiales

Director de la Tesis: Dr. Fernando Martínez Bustos

Directora de la Tesis: Dra. Yolanda Salinas Moreno

Santiago de Querétaro, Qro.

mayo de 2015.

**CINVESTAV
IPN
ADQUISICION
LIBROS**

CLASIF.. CA 00250
ADQUIS.. CA-265-351
FECHA: 21- Octubre - 2015
PROCED.. Don - 2015
\$

ID: 224325 1001

Dedicatoria

Le dedico esta victoria a mi Padre Celestial quien cumple los anhelos de mi corazón, porque mis sueños son también los suyos. Sea a Jesucristo toda la honra, la gloria y la alabanza!

A mis padres, José de Jesús García y Verónica Tejeda por darme la vida.

A mi amado esposo, Víctor Barrera

y a mi hija, Verónica Barrera.

Agradecimientos

Al Dr. Fernando Martínez Bustos y a la Dra Yolanda Salinas Moreno por ser mis directores de tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Rafael Ramírez Bon, el Dr. Juan Francisco Pérez Robles, el Dr. Pedro A. Vázquez Landaverde y el Dr. Sergio Jiménez Sandoval.

A los auxiliares de los laboratorios del CINVESTAV quienes me apoyaron en los experimentos realizados y con quienes compartí mis más agradables experiencias: M.C. José Juan Veles Medina, Ing. María del Carmen Delgado Cruz, M.C. Reyna Araceli Mauricio Sánchez, Ing. Francisco Rodríguez Melgarejo, Ing. José Eleazar Urbina Alvarez, Ing. Luz Ma Reyna Avilés, Edmundo Gutiérrez, Q.A. Martín Adelaido Hernández Landaverde, M.C. Rivelino Flores Farías y al Ing. José Alfredo Muñoz Salas.

Agradezco a los Auxiliares del laboratorio de Inifap por su valiosa amistad y por ayudarme en la extracción, cuantificación e identificación de antocianinas: Elvia Joaquín, Silvia Díaz Ortiz, Leticia García, Alberto y César Sánchez.

Agradezco el conocimiento compartido por mis compañeros de CINVESTAV: Ulises Velasco, Elsa M. Campechano, Guadalupe Figueroa, Laura Motiel, Amira Calvo y Alma Villareal.

Agradezco la amistad y el apoyo técnico de la Lic. Elvia Araujo

Agradezco el apoyo administrativo del Director del plantel el Dr. Gerardo Trápaga y de todo el personal de CINVESTAV, por brindarme las instalaciones y las facilidades para elaboración del presente.

Finalmente agradezco la beca otorgada del CONACYT.

INDICE DE CUADROS

Cuadro II. 1. Descripción general de los procesos de microencapsulación de antocianinas	17
Cuadro II. 2. Fuentes de almidón.....	22
Cuadro II. 3. Modificaciones químicas y físicas de los almidones.....	23
Cuadro III. 1. Contenido de antocianinas y polifenoles, parámetros de color en maíz negro, maíz molido y FPCA de las muestras analizadas.....	44
Cuadro III. 2. Identificación de antocianinas en maíz negro.....	46
Cuadro IV. 1. Grado de sustitución, índice de absorción de agua e índice de solubilidad de agua de los almidones nativos, hidrolizados con HCl, esterificados con n-OSA y anhídrido acético, y entrecruzados con tripolifosfato de sodio.....	59
Cuadro IV. 2. Propiedades de gelatinización de los almidones: nativos, hidrolizados, esterificados y fosfatados.....	61
Cuadro IV. 3. Propiedades de empastado de los almidones nativos y modificados.....	66
Cuadro V. 1. Condiciones experimentales empleadas para el procedimiento de microencapsulación.....	76
Cuadro V. 2. Bandas de absorción RAMAN observadas en el espectro del almidón de maíz ceroso tostado	78
Cuadro V. 3. Efectos de la temperatura de entrada y contenido de sólidos en las microesferas.....	81
Cuadro VI. 1. Características fisicoquímicas de las microesferas.....	103
Cuadro VI. 2. Recuperación de antocianinas ó polifenoles y eficiencia de encapsulación del proceso de secado por aspersión.....	107
Cuadro VI. 3. Perfil de antocianinas en el extracto de las microesferas preparadas	109
Cuadro VI. 4. Bandas de absorción FTIR asignadas.....	112
Cuadro VII. 1. Parámetros de ajuste para los modelos propuestos para las isotermas de adsorción elaboradas a 40°C.....	130
Cuadro VII. 2. Retención de antocianinas (RA) después de 30 días de almacenamiento a 40°C.....	132
Cuadro VII. 3. Parámetros de ajuste para los modelos propuestos para las isotermas de adsorción de MNS elaboradas a 4, 30 y 40°C.....	135
Cuadro VII. 4. Retención de antocianinas después de 30 días de almacenamiento almacenamiento a 30 y 4 oC.....	136
Cuadro VIII. 1. Niveles de los factores utilizados en el diseño experimental.....	143

Cuadro VIII. 2. Perfil de antocianinas de las microesferas elaboradas con las mezclas de agentes encapsulantes	149
Cuadro VIII. 3. Ensayos seleccionados mediante el modelo y sus respectivas variables de respuesta.	151
Cuadro VIII. 4. ANOVA para la eficiencia de encapsulación y la higroscopicidad. ...	155
Cuadro VIII. 6. Resumen estadístico del modelo	156

INDICE DE FIGURAS

Figura II. 1. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).....	5
Figura II. 2. Morfología de microesferas (Nandiyanto and Okuyama, 2011).	11
Figura II. 3. Diagrama del Secador por Aspersión Lab-Plan SD-03.	13
Figura II. 4. Estructura de microesferas con maltodextrinas y proteína.	15
Figura II. 5. Estructura química de la amilosa (A) y de la amilopectina (B).....	21
Figura II. 6. Diagrama general de un extrusor	25
Figura II. 7. Mecanismo propuesto en la fosfatación del almidón con tripolifosfato de sodio (fuente: Lim y Seib, 1993).....	28
Figura II. 8. Reacciones químicas que ocurren durante la acetilación del almidón.	29
Figura II. 9. Esterificación del almidón con 1-octenil-anhídrido succínico (Song et al., 2006).....	30
Figura III. 1. Idétficación de antocianinas mediante HPLC. Cromatograma de los estándares de antocianinas (A), extracto de antocianinas de maíz (B) extracto hidrolizado con HCl (C), extracto hidrolizado con NaOH (D).	45
Figura IV. 1. Extrusión reactiva.....	53
Figura IV. 2. Patrón de difracción de rayos X del almidón de maíz normal, almidón de maíz normal hidrolizado, almidón de maíz hidrolizado y succinatado, almidón de maíz hidrolizado y acetilado, almidón hidrolizado, succinatado y extrudido, almidón hidrolizado, acetilado y extruido.....	62
Figura IV. 4. Patrón de difracción de rayos X del almidón de maíz ceroso, almidón de maíz ceroso hidrolizado, almidón de maíz hidrolizado y succinatado, almidón de maíz hidrolizado y acetilado, almidón hidrolizado, succinatado y extrudido, almidón hidrolizado, acetilado y extruido.	62
En la Figura IV. 5, se muestran los almidones modificados. Como se puede observar se perdió la estructura granular del almidón. Los seis tratamientos realizados al almidón de maíz alteraron la apariencia y estructura del granulo nativo (Figuras IV.5 (a)-(d); se presentan partículas de formas irregulares con superficies fragmentadas y rugosas. Los almidones hidrolizados conservaron su estructura granular (Figuras IV. 5 (f) y (g). La morfología observada en los almidones modificados corrobora la pérdida de cristalinidad provocada por el proceso de extrusión.	63

Figura IV. 6. Microfotografías de los almidones de maíz normal y ceroso modificados e hidrolizados: (a) NS. (b) CS. (c) NA. (c)CA, (d) NF. (e) CF. (f) NH. (g) CH.	64
Figura IV. 7. Perfil de viscosidad de los almidones de maíz normal y maíz hidrolizado mediante un ARV.....	67
Figura IV. 8. Perfil de viscosidad de los almidones de maíz normal y modificado por fosfatación, acetilación y succinilación.	68
Figura V. 1. Espectro Raman del almidón nativo ceroso (C). del almidón fosfatado (CF) y del tripolifosfato de sodio (TPS).....	79
Figura V. 2. SEM de las microesferas preparadas con almidón fosfatado mediante las siguientes condiciones: (a) 10 % at 130 °C. (b) 10 % at 150 °C. (c) 10 % at 170 °C, (d) 15 % at 130 °C, (e) 15 % at 150 °C, (f) 15 % at 170 °C. (g) 20 % at 130 °C, (h) 20 % at 150 °C and (h) 20 % at 170 °C.	82
Figura V. 3. Distribución del tamaño de partícula de las microesferas producidas al 10 % de sólidos producidas a 130, 150 y 170 °C.	85
Figura V. 4. Distribución del tamaño de partícula de las microesferas producidas al 15 % de sólidos producidas a 130, 150 y 170 °C.	86
Figura V. 5. Distribución del tamaño de partícula de las microesferas producidas al 20 % de sólidos producidas a 130, 150 y 170 °C.	87
Figura VI. 1. Solubilidad de las microesferas.....	92
Figura VI. 2. Vista en 3D de microesferas de almidón succinatado.....	95
Figura VI. 3. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidones normal y ceroso de maíz. MN: microesferas de almidón normal de maíz hidrolizado; MC: microesferas de almidón ceroso de maíz hidrolizado.	97
Figura VI. 4. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidón de maíz succinatado. MNS: microesferas de almidón de maíz normal succinatado; MCS: microesferas de almidón ceroso succinatado.	98
Figura VI. 5. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidón de maíz acetilado. MCS: micropartícula de almidón ceroso succinatado de maíz; MNS: micropartícula de almidón normal succinatado de maíz.....	99
Figura VI. 6. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidón de maíz fosfatado. MNF: micropartícula de almidón de maíz fosfatado; MCF: micropartícula de almidón ceroso fosfatado.	100
Figura VI. 7. Distribución del tamaño de partícula de los diferentes tratamientos.	102
Figura VI. 8. Espectro FTIR del almidón ceroso de maíz (C). del maíz ceroso acetilado (CA), del maíz ceroso succinatado (CS), del almidón normal de maíz (N), del maíz acetilado (NA), del maíz succinatado (NS).....	111
Figura VI. 9. Espectro FTIR del extracto de antocianinas (E). de las microesferas preparadas con: almidón normal de maíz (MN), almidón normal succiniladío (MNS), almidón almidón normal acetilado (MNA) y almidón normal fosfatado (MNF).....	111

Figura VII. 1. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal hidrolizado.....	122
Figura VII. 2. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal succinatado.....	123
Figura VII. 3. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal acetilado.....	124
Figura VII. 4. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz ceroso hidrolizado.....	125
Figura VII. 5. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz ceroso succinatado.....	126
Figura VII. 6. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz ceroso acetilado.....	127
Figura VII. 7. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal succinatado a 4, 30 y 40°C.....	133
Figura VII. 9. Calor isostérico de adsorción de agua para microesferas de antocianinas preparadas con almidón succinatado.....	137
Figura VIII. 1. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M4 (AS50:MD50).....	146
Figura VIII. 2. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M5(AS50:MD50).....	147
Figura VIII. 3. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M6 (AS25:AA25:MD50).....	147
Figura VIII. 4. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M7 (AS49.5:AA49.5:P1).....	147
Figura VIII. 5. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M12 (AS74:MD25:P1).....	147
Figura VIII. 6. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M13 (AA49:MD50:P1).....	147
Figura VIII. 7. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M15 (AS98:P2).....	148
Figura VIII. 8. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M16 (AA98:P2).....	148
Figura VIII. 9. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M18 (AA73:MD25:P2).....	148
Figura VIII. 10. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M19 (AS48:MD50:P2).....	148
Figura VIII. 11. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M20 (AS37.5:AA37.5:MD25).....	148
Figura VIII. 12. Gráfico de superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación y la higroscopicidad.....	152
Figura VIII. 13. Gráficas de probabilidad normal para la eficiencia de encapsulación y la higroscopicidad.....	157

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Contenido de antocianinas totales
E	Extracto de antocianinas de maíz
GS	Grado de sustitución.
MC	Microesferas de almidón de maíz ceroso
MEB	Microscopía electrónica de barrido.
MNA	Microesferas de almidón de maíz normal acetilado
RA	Retención de antocianinas.
C	Almidón de maíz ceroso hidrolizado.
CAS	Contenido de antocianinas superficiales
EE	Eficiencia de encapsulación.
FPCA	Fracción de las capas de pericarpio y aleurona.
MCA	Microesferas de almidón de maíz ceroso acetilado
MN	Microesferas de almidón normal de maíz.
N	Almidón de maíz normal hidrolizado.
NA	Almidón de maíz normal hidrolizado y acetilado.
RE	Rendimiento de la encapsulación.
TPS	Tripolifosfato de sodio
CA	Almidón de maíz ceroso hidrolizado y acetilado.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Esquema general de la tesis	3
I.2 Contribuciones	4
II. ESTADO DEL ARTE	4
II.1 Antocianinas	4
II.1.1 Importancia de las antocianinas	6
II.1.2 Antocianinas en maíz	6
II.1.3 Factores químicos que afectan el color y la estabilidad de las antocianinas	7
II.2 Encapsulación	9
II.2.1 Proceso de secado por aspersión (Spray Drying)	12
II.2.2 Agentes encapsulantes utilizados en la microencapsulación	13
II.2.3 Mezclas de agentes encapsulantes	15
II.2.4 Factores que influyen en el procesamiento	19
II.3 Generalidades del almidón	20
II.3.1 Componentes del almidón	20
II.3.2 Fuentes de obtención	21
II.4 Almidones modificados	22
II.4.1 Extrusión	24
II.4.2 Fosfatación	26
II.4.3 Acetilación	28
II.4.4 Succinilación	30
II.5 REFERENCIAS	31
II.6 HIPÓTESIS	38
II.7 OBJETIVOS	38
III. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS	39
III.1 Introducción	39
III.2 Materiales y métodos	40
III.2.1 Materiales	40
III.2.2 Color del grano	40
III.2.3 Extracción de antocianinas de maíz	40
III.2.4 Contenido de antocianinas totales	41
III.2.5 Contenido de polifenoles totales	41
III.2.6 Identificación del perfil de antocianinas mediante HPLC	41

III.3	Resultados y discusión	43
III.3.1	Contenido de antocianinas y polifenoles totales	43
III.3.2	Identificación del perfil de antocianinas	44
III.4	Conclusiones	46
III.5	Referencias	47
IV.	PREPARACIÓN DE AGENTES ENCAPSULANTES	50
IV.1	Introducción	50
IV.2	Materiales y métodos	51
IV.2.1	Hidrólisis ácida	51
IV.2.2	Succinilación	52
IV.2.3	Acetilación de almidón	52
IV.2.4	Fosfatación	52
IV.2.5	Grado de sustitución en almidón fosfatado	53
IV.2.6	Grado de sustitución en almidón acetilado y succinilado	54
IV.2.7	Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB)	54
IV.2.8	Calorimetría de Barrido Diferencial (CDB)	55
IV.2.9	Características de viscosidad	56
IV.2.10	Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)	56
IV.2.11	Difracción de rayos X	57
IV.3	Resultados y discusión	57
IV.3.1	Grado de sustitución de los almidones modificados (GS), índice de absorción de agua (IAA) e índice de solubilidad de agua (ISA).	57
IV.3.2	Propiedades de gelatinización	59
IV.3.3	Difracción de rayos X	62
IV.3.4	Caracterización morfológica de los almidones modificados	63
IV.3.5	Propiedades de empastado	65
IV.4	Conclusiones	69
IV.5	Referencias	70
V.	SELECCIÓN DE CONDICIONES OPERATIVAS DEL PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN (ANÁLISIS PRELIMINAR)	74
V.1	Introducción	74
V.2	Materiales y métodos	75
V.2.1	Secado por aspersión	75
V.2.2	Espectroscopia RAMAN	75
V.2.3	Microscopia Electrónica de Barrido	76
V.2.4	Color	76
V.2.5	Rendimiento de la encapsulación (RE)	77
V.2.6	Retención de antocianinas después del secado por aspersión	77
		X

V.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
V.3.1	Espectroscopía RAMAN de los almidones fosfatados	77
V.3.2	Morfología y tamaño de las microesferas	80
V.3.3	Color de las microesferas	83
V.4	Conclusiones	88
V.5	Referencias	88
VI.	ENCAPSULACIÓN DE ANTOCIANINAS UTILIZANDO ALMIDONES MODIFICADOS	89
VI.1	Introducción	89
VI.2	Materiales y métodos	90
VI.2.1	Microencapsulación	90
VI.2.2	Caracterización morfológica	90
VI.2.3	Color	91
VI.2.4	Contenido de humedad	91
VI.2.5	Actividad de agua	91
VI.2.6	Solubilidad en agua de las microesferas	91
VI.2.7	Densidad	92
VI.2.8	Antocianinas totales encapsuladas	92
VI.2.9	Contenido de polifenoles totales	93
VI.2.10	Perfil de antocianinas	94
VI.2.11	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIR)	94
VI.3	RESULTADOS	94
VI.3.1	Morfología	94
VI.3.2	Distribución del tamaño de partícula	101
VI.3.3	Densidad	104
VI.3.4	Contenido de humedad, actividad de agua (a_w) e higroscopicidad	104
VI.3.5	Contenido de Antocianinas y Polifenoles en microesferas	105
VI.3.6	Perfil de antocianinas después del secado por aspersión	108
VI.3.7	FTIR	110
VI.4	Conclusiones	113
VI.5	REFERENCIAS	113
VII.	ELABORACIÓN DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN	116
VII.1	Introducción	116
VII.2	Materiales y métodos	118
VII.2.1	Modelado de las isotermas de adsorción de las microesferas	118
VII.2.2	Estabilidad de las antocianinas encapsuladas	120
VII.2.3	Análisis estadístico	120

VII.3	Resultados y discusión	121
VII.3.1	Isotermas de adsorción de las microesferas a 40 °C	121
VII.3.2	Estabilidad de las antocianinas encapsuladas	131
VII.3.3	Isotermas de adsorción del almidón succinatado a 30 y 4°C	133
VII.3.4	Estabilidad de las microesferas de almidón succinatado	136
VII.3.5	Calor isostérico de adsorción	137
VII.4	Conclusiones	138
VII.5	Referencias	139
VIII.	PERSPECTIVAS	140
IX.	APÉNDICE.	141
IX.1	Mezclas de agentes encapsulantes para la microencapsulación de antocianinas de maíz	141
IX.2	Introducción	141
IX.2.1	Materiales y métodos	142
IX.2.2	Preparación de las microesferas mediante secado por aspersión	142
IX.2.3	Eficiencia de encapsulación	142
IX.2.4	Higroscopicidad	143
IX.2.5	Análisis estadístico	143
IX.3	RESULTADOS Y DISCUSIONES	146
IX.3.1	Cambios en el perfil de antocianinas durante el secado por aspersión	146
IX.3.2	Evaluación del diseño experimental	150
IX.3.3	Análisis de varianza (ANOVA)	154
	Conclusiones	158
IX.4	Referencias	158
X.	ANEXO	160
X.1	Publicaciones	161
X.2	Participaciones en congresos	161

RESUMEN

Recientemente, el interés en el uso potencial de las antocianinas a partir de maíz negro (*Zea mays* L.) como colorante natural ha aumentado. Las antocianinas no sólo imparten color a los alimentos que los contienen, sino que también se han relacionado con los beneficios a la salud. Sin embargo, su incorporación en matrices de alimentos procesados está limitada, debido a que son sensibles a las condiciones ambientales. La encapsulación mediante secado por aspersion aumenta la vida útil de los compuestos bioactivos sensibles al calor tales como las antocianinas. La encapsulación de las antocianinas de maíz negro se llevó a cabo usando agentes de encapsulación producidos a partir de derivados de almidón de maíz. Los almidones de maíz normal y ceroso fueron esterificados con anhídrido acético, anhídrido octenil succínico y tripolifosfato de sodio. Antes de la esterificación con anhídrido acético y con anhídrido octenil succínico, ambos almidones se hidrolizaron con ácido clorhídrico. La esterificación con tripolifosfato de sodio se realizó por extrusión reactiva. La influencia de diferentes almidones modificados como agentes de encapsulantes se investigaron con relación a la morfología de las microesferas (SEM), la eficiencia de encapsulación (EE), isotermas de adsorción y retención de antocianinas (AR) después de 30 días de almacenamiento a diferentes a_w (0.11 hasta 0.94) a 40 °C. Las imágenes de SEM mostraron microesferas esféricas con superficies rugosas. Los valores de EE fueron mayores en los almidones modificados con respecto a almidones de maíz normal y cerosos hidrolizados. Después del almacenamiento, las microesferas producidas con almidón succinatado de maíz normal presentaron la mayor AR en el intervalo de 0.11-0.75 a_w . Se encontró que los datos experimentales estuvieron bien representados por medio de los modelos de GAB y Peleg.

ABSTRACT

Recently, it has increased an interest in the potential use of anthocyanins from purple maize (*Zea mays* L.) as natural colorant. The anthocyanins not only give color to the foods containing them, but also they have benefits to the human health. However, their incorporation into processed food matrices is limited since anthocyanins are sensitive to adverse environmental factors. Encapsulation by spray drying increases the shelf-life of heat sensitive bioactives such as anthocyanins. The encapsulation of purple maize anthocyanins was carried out by using encapsulating agents produced from maize starch derivatives. Normal and waxy maize starches were esterified with acetic anhydride, anhydride n-octenyl succinic and sodium triphosphosphate. Prior to the esterification process, both normal and waxy maize starches were hydrolyzed with hydrochloric acid. On the other hand, native starches were phosphorylated by reactive extrusion by using sodium tripoliphosphate. The behaviour of different derivative starches as encapsulating agents were investigated in this thesis with respect to the morphology of the microcapsules by SEM, the encapsulation productivity (EP), the encapsulation efficiency (EE), the adsorption isotherms and the anthocyanins retention (AR) after 30 days of storage at different water activities (11–94 a_w) at 40 °C. SEM images showed spherical microparticles with rough surfaces. The values of EE were higher in starch derivatives with respect to hydrolyzed native normal and waxy maize starches. After storage, microparticles produced with succinylated normal maize starch had the highest AR in the range of 0.11–0.75 a_w . It was found that the experimental data were well represented by means of the GAB and Peleg models.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz negro (*Zea mays* L.) se utiliza principalmente para preparar " atole ", una bebida tradicional del estado de Tlaxcala. Debido a su intenso color negro, éste contiene una cantidad considerable de antocianinas. Recientemente, el interés en el uso de las antocianinas de maíces pigmentados está en aumento. Las antocianinas no sólo confieren color a los alimentos, sino que también se reporta que presentan actividad antioxidante, vasoprotectiva, antiinflamatoria, anticancerígena, antiobesidad y contrarresta la diabetes (Rojo *et al.*, 2012, Shih *et al.*, 2010).

La estabilidad de las antocianinas depende de factores tales como: su estructura molecular, el pH, la temperatura, la intensidad de la luz, la presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, oxígeno, ácido ascórbico, azúcares, entre otros (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011). A diferencia de los colorantes sintéticos, las antocianinas presentan baja toxicidad (Bagchi *et al.*, 2006), aunque su uso como aditivo alimenticio es limitado ya que son sensibles a los factores ambientales.

Existen diferentes mecanismos para la estabilización de las antocianinas. El más popular es el de microencapsulación mediante secado por aspersion (Cavalcanti *et al.*, 2011). Esta tecnología "consiste en el aislamiento de sustancias activas para la obtención de microesferas de forma esférica y tamaño micrométrico en las cuales, el material activo o núcleo está protegido del medio ambiente por un material de pared" (Nesterenko *et al.*, 2013a). La utilización de antocianinas encapsuladas en lugar de extractos antocianicos puede aumentar su estabilidad en un refresco isotónico (Burin *et al.*, 2011), en helados (Çam *et al.*, 2014) y en galletas (Davidov -Pardo *et al.*, 2012). La pared actúa como una barrera física contra los efectos del oxígeno, el agua, la luz, e inhibe la degradación química y enzimática (Wang *et al.*, 2009).

La selección de un material de pared adecuado es importante para la estabilidad de las antocianinas. Varios agentes encapsulantes se han utilizado en la microencapsulación, éstos incluyen: gomas, polisacáridos, lípidos, proteínas, fibras y mezclas de ellos (Davidov-Pardo *et al.*, 2013). En la microencapsulación de antocianinas se han utilizan almidones de diversas fuentes, esto es debido a que son

abundantes en la naturaleza (Cai y Corke, 2000, Robert *et al.*, 2010, Tonon *et al.*, 2010). Estos incluyen el maíz, la yuca y la papa, sin embargo, los almidones nativos aumentan su eficiencia cuando son modificados.

Entre los almidones modificados utilizados como agentes encapsulantes se encuentran: las maltodextrinas, ciclodextrinas y dextrinas, resultantes de la acción de ácidos o enzimas específicas en los almidones (Spada 2013). Las maltodextrinas son consideradas como buenos agentes encapsulantes durante el proceso de secado por aspersión, ya que presentan una alta solubilidad y baja viscosidad a altas concentraciones de sólidos (Cai y Corke, 2000, Robert *et al.*, 2010, Tonon *et al.*, 2010). Por otro lado, los almidones modificados por hidrólisis ácida han mostrado buenas propiedades de encapsulación (Palma-Rodríguez *et al.*, 2013, Spada *et al.*, 2012).

Entre los almidones esterificados, el almidón fosfatado presenta una alta solubilidad y ha mostrado una eficiencia de microencapsulación similar a las maltodextrinas (84.5 %) en la encapsulación de betalainas (Cai & Corke, 2000). La fosfatación mediante extrusión reactiva es una buena alternativa para producir agentes encapsulantes, debido a su bajo costo, ausencia de efluentes y corto tiempo de reacción (Chang y Lii, 1992)

En busca de nuevos agentes encapsulantes, los investigadores han cambiado la naturaleza hidrofílica del almidón mediante la introducción de grupos hidrofóbicos como la esterificación con anhídrido n-octenil succinico y anhídrido acético, los cuales producen almidones de naturaleza anfifílica (Shogren *et al.*, 2000). Por ejemplo: el almidón acetilado de papa incrementa la eficiencia en microencapsulación de ácido gálico de un 47 % a un 61 % (Robert *et al.*, 2010); el almidón succinatado retiene una mayor cantidad de Zn-clorofila con relación a las maltodextrinas y la goma arábiga (Porrarud y Pranee, 2010). Por otra parte, se ha demostrado que una hidrólisis posterior de los almidones modificados muestran una mayor actividad superficial y menor viscosidad que los propios almidones nativos y modificados (Konowal *et al.*, 2012, Murúa-Pagola *et al.*, 2009).

El presente trabajo tiene como objetivo la preparación y caracterización de microesferas de antocianinas utilizando almidones modificados como agentes

encapsulantes. Con el fin de evaluar el efecto del tipo de almidón en la estructura y eficiencia de encapsulación de las microesferas, se utilizaron almidones de maíz normal y ceroso. Los almidones de los dos tipos de maíz se esterificaron con anhídrido *n*-octenil succínico, anhídrido acético y tripolifosfato de sodio. La esterificación con tripolifosfato de sodio se realizó mediante extrusión reactiva; la esterificación con anhídrido acético y anhídrido *n*-octenil succínico se realizó mediante modificaciones químicas sucesivas que incluyeron: hidrólisis ácida, esterificación con anhídrido acético ó con anhídrido octenil succínico y la posterior hidrólisis por extrusión. Los almidones modificados fueron caracterizados fisicoquímicamente y para evaluar su desempeño en la encapsulación de antocianinas se evaluó la eficiencia de encapsulación y la retención de antocianinas después de 30 días de almacenamiento a actividades de agua de 0.11- 0.84 a_w a 40 °C. Finalmente, las características de adsorción de agua de las microesferas fueron determinadas con los modelos matemáticos: GAB, PELEG, Henderson y Caurie.

1.1 Esquema general de la tesis

El trabajo de tesis se dividió en diferentes etapas:

La 1ª etapa (Sección III), trata de la extracción de las antocianinas de maíz negro, en la cual, se realizó la cuantificación, e identificación de los compuestos presentes en el extracto.

La 2ª etapa (Sección IV), abarca la preparación de los agentes encapsulantes y la caracterización fisicoquímica de los almidones.

En la 3ª etapa (Sección V), se presentan pruebas preliminares para la selección de las mejores condiciones operativas del proceso de secado por aspersión utilizando el almidón de maíz fosfatado.

En la 4ª etapa (Sección VI), ya con las condiciones seleccionadas, se presentan las microesferas producidas con los almidones modificados e hidrolizados y se muestra la caracterización fisicoquímica de las mismas. En esta etapa se suprime el uso del almidón fosfatado.

En la 5ª etapa (Sección VII), se presentan las propiedades de adsorción de agua y la retención de antocianinas de las microesferas después de 30 días de almacenamiento a diferentes actividades de agua.

I.2 Contribuciones

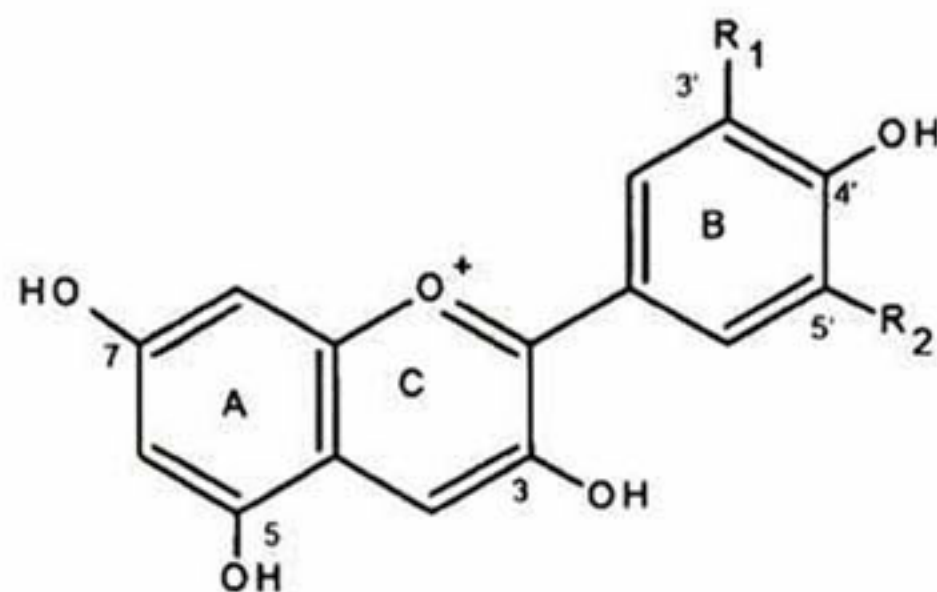
1. No existen reportes referentes a la comparación del desempeño de agentes encapsulantes preparados a partir de almidón de un mismo origen botánico con diferente composición amilosa/amilopectina. En el presente trabajo dos tipos de almidones (normal y ceroso de maíz) fueron modificados de igual manera, y presentaron un desempeño diferente en la encapsulación y en la estabilidad de antocianinas de maíz. Los derivados de almidón normal de maíz presentaron una mayor retención de antocianinas en comparación con los derivados de almidón ceroso durante el almacenamiento.
2. No existen trabajos anteriores al presente, en los cuales se hayan utilizado almidones anfifílicos como los acetilados y succinatados en la encapsulación de antocianinas. En el presente trabajo se observó que los almidones con las esterificaciones hidrofóbicas ejercieron un efecto protector contra la humedad y favorecieron la retención de antocianinas. En cambio, los almidones fosfatados (hidrofílicos) fueron altamente higroscópicos, siendo algo muy desfavorable para la estabilidad de las antocianinas.
3. Se ha mencionado por algunos autores que la presencia de indentación en las microesferas, es provocada por el vacío que se genera en la cámara del MEB. Mediante la observación de las microesferas por microscopia confocal, se pudo comprobar que las indentaciones presentes son características del secado por aspersion.
4. Con relación a las contribuciones realizadas en nuestro equipo de investigación, se pudieron montar las técnicas de espectroscopia RAMAN en la caracterización de almidones fosfatados.

II. ESTADO DEL ARTE

II.1 Antocianinas

Las antocianinas son el grupo más grande e importante de pigmentos solubles en agua presentes en la naturaleza. Éstas son responsables de los colores: azul, morado, rojo y naranja de muchas frutas, flores y otras partes de las plantas. Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C.

Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (**Figura II. 1**).



Aglicona	Sustitución		$\lambda_{\max}/(\text{nm})$
	R ₁	R ₂	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Figura II. 1. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Los incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Stintzing *et al.*, 2002). En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/ó 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico (Stintzing *et al.*, 2002). El tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones

glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades negro.

II.1.1 Importancia de las antocianinas

Las aplicaciones comerciales de las antocianinas como colorantes de alimentos incluyen refrescos, conservas de frutas (mermeladas, conservas de frutas), productos de confitería de azúcar (jaleas), productos lácteos (yogures, esencialmente), mezclas secas (mezclas para postres y bebidas en polvo ácido) y productos con menos frecuencia congelados (helado) y algunas bebidas alcohólicas. Entre estas aplicaciones, los refrescos han sido el objetivo principal y es ideal para el uso de las antocianinas como colorante. El interés por las antocianinas y la investigación científica ha aumentado debido a que no solo confieren color a los productos que las contienen, sino también a sus beneficios nutraceuticos, principalmente como antioxidantes naturales y por la creciente preocupación por la toxicidad de los colorantes sintéticos usados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Hallagan 1991, Breakey *et al.*, 2007).

Las antocianinas presentan diversos beneficios a la salud. Tsuda *et al.*, (2003) proporcionaron la evidencia de que al alimentar ratones con antocianinas extraídas de maíz azul y combinando con una dieta alta en grasas, reportaron que no hubo aumento de peso ni de tejido adiposo en los ratones. Los síntomas típicos provocados por una dieta alta en grasas como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, y la hiperleptinemia no se presentaron cuando los ratones también ingirieron las antocianinas. Los experimentos sugieren que las antocianinas, como componentes funcionales de los alimentos, puedan ayudar en la prevención de la obesidad y de la diabetes, disfunción del hígado, hipertensión, problemas de visión, infecciones microbianas, diarrea etc. (Lila, 2004).

II.1.2 Antocianinas en maíz

A nivel mundial existen razas de maíz de distintos colores como el blanco, amarillo, rojo, morado y azul; en México se ha encontrado una de las diversidades genéticas más grande, con aproximadamente 41 razas (Ortega *et al.*, 1991), siendo los maíces azules y rojos los más comunes. Diversos estudios en maíces pigmentados

se han enfocado al aislamiento de las antocianinas (López-Martínez *et al.*, 2009, Salinas Moreno *et al.*, 2005), en la caracterización química y estructural (Pedreschi y Cisneros-Zevallos, 2007, González-Manzano *et al.*, 2008) y en su capacidad antioxidante (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006).

En maíz la mayoría de las antocianinas derivan de cianidina; se tienen antocianinas cuya estructura está conformada por la antocianidina y un azúcar unido comúnmente a la posición 3 de la estructura de tres carbonos, estas son las de tipo no acilado. Sin embargo, es posible que al azúcar se una un radical acilo proveniente de ácidos orgánicos, ya sean alifáticos o aromáticos. Cuando esto ocurre se tienen las antocianinas de tipo aciladas (de Pascual-Teresa y Sanchez-Ballesta, 2008). La presencia de grupos acilo en la molécula de antocianina le confiere estabilidad al pigmento ante condiciones extremas de pH y temperatura (Dougall, *et al.*, 1997). En las no aciladas el principal azúcar reportado es la glucosa (Aoki *et al.*, 2002) aunque en algunos trabajos recientes se ha identificado también la rutinosa, que es un disacárido (Zilic *et al.*, 2012). En la planta de maíz, las antocianinas están presentes en diferentes estructuras, que abarcan desde tallo, vaina, hojas, e inflorescencias; en la mazorca se pueden encontrar en las brácteas, el raquis, y en el grano. En el grano de maíz se ha reportado la presencia de antocianinas principalmente en el pericarpio, en la capa de aleurona, o en ambas estructuras (Salinas *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2012). La presencia de estos compuestos en el embrión o endospermo, excluyendo la aleurona, es marginal (Cui *et al.*, 2012). El contenido de antocianinas totales, que es el que se determina en los extractos obtenidos de los granos de maíz, puede variar en función del color del grano. En general, los maíces con tonalidades azul/moradas, negros o magentas presentan un contenido mayor que los de tonos rojos (Salinas *et al.*, 1999; Lopez-Martinez *et al.*, 2009; Zilic *et al.*, 2012).

II.1.3 Factores químicos que afectan el color y la estabilidad de las antocianinas

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos, 2004).

Factores como: su misma estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

Efecto del pH

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a 2, básicamente 100 % del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH⁺) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A, A⁻) de color negro que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999).

Efecto de la temperatura

Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Timberlake, 1980). La velocidad de degradación de las antocianinas aumenta a medida que la temperatura se incrementa (Yang *et al.*, 2008, Yang y Zhai, 2010).

Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico

El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas está relacionado. Sondheimer y Kertesz, (1953) reportaron que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargonidina-3-glucósido proveniente de la fresa causaban grandes pérdidas de antocianinas, no obstante, cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro en el color. De igual manera, Markakis *et al.*, (1957) reportaron un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina-3-glucósido en solución. En investigaciones más recientes, Garzón y Wrolstad (2002) confirmaron la aceleración

de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado por Jurd (1972) y Poei-Langston (1981) como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos. La presencia de ácido ascórbico muestra un impacto negativo en la estabilidad de las antocianinas, provocando la degradación de los mismos. La cual consiste en la condensación de ácido ascórbico y el carbono cuatro de la molécula de antocianina, causando la pérdida de ambos (De Rosso y Mercadante, 2007).

Otros factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

La concentración del pigmento y la actividad de agua de la matriz afectan la estabilidad del color. Garzón y Wrolstad (2002) compararon la estabilidad de la antocianina de fresa (pelargonidina-3-glucósido) con la de la antocianina de la cáscara de rábano (pelargonidina-3-soforósido 5-glucósido acilada con ácidos aromáticos y alifáticos) y encontraron que dicha estabilidad era independiente de la estructura, a una misma concentración de pigmento. Hoshino *et al.*, (1992) demostraron que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de auto-asociación entre dos cationes flavilium, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilium y protegiendo la molécula de antocianina. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzón y Wrolstad, 2001). Por lo anterior, muchos estudios se han realizado con el objetivo de aumentar la estabilidad de estas sustancias. Entre ellas la encapsulación es una de las principales técnicas para aumentar su estabilidad.

II.2 Encapsulación

La encapsulación por secado por aspersion es una técnica ampliamente utilizada para la protección de pigmentos naturales con el fin de ser usados como colorantes y/o como alimentos funcionales. Con lo que respecta al uso de colorantes naturales; por ejemplo, para ser empleados en la elaboración de cosméticos, Ge *et al.*, (2009) extrajeron pigmentos de *Rosa hybridum* mediante un proceso de microondas y los encapsularon en cera de abeja con ácido esteárico (1:1) y se observó que gracias

a la encapsulación hubo un aumento en la estabilidad de los pigmentos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. También se han extraído y encapsulado las betalainas del betabel con maltodextrinas (Azeredo *et al.*, 2007), a fin de ser introducidas en yogurt. Se han elaborado también por extrusión, cereales coloreados para desayuno con pigmentos naturales de frutos (Camire *et al.*, 2007). Además de servir como colorantes naturales, los pigmentos presentan actividad antioxidante, como es el caso de la tuna que contiene betalainas, carotenoides y polifenoles, por lo que su encapsulación con maltodextrinas e inulina puede ser beneficioso en su incorporación en alimentos funcionales (Saénz *et al.*, 2009). En los alimentos, es importante la impartición de sabor, por lo que también se ha realizado la microencapsulación de especias saborizantes mediante el uso de; goma arábica, maltodextrinas y almidón Hi Cap100 en la encapsulación de *Elleataria cardamomum* (Kri hnan *et al.*, 2005); goma arábica y almidón Hi Cap100, en el encapsulamiento de pimienta negra (Shaikh *et al.*, 2006); almidones succinatados, acetilados y fosfatados en el encapsulamiento de aceite de limoneno (Murúa-Pagola *et al.*, 2009); estereato de almidón de sago (Varavinit *et al.*, 2001) en el encapsulamiento de aceite de limón. Para enmascarar el sabor desagradable del aceite de pescado se ha investigado el uso de almidones modificados como materiales pared de las microesferas (Chung *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el problema principal asociado con el almacenamiento de antocianinas es su inestabilidad. Por lo tanto, la estabilización de las antocianinas es el objetivo de muchos trabajos. Entre los métodos de estabilización existentes de antocianinas, la encapsulación es una técnica interesante. La utilización de antocianinas encapsuladas en lugar de compuestos libres puede superar los inconvenientes de su inestabilidad, así como mejorar la biodisponibilidad de antocianinas. De acuerdo con Cavalcanti *et al.*, (2011), la encapsulación es una de las principales técnicas para aumentar la estabilidad de las antocianinas. Diferentes técnicas han sido utilizadas para la encapsulación de antocianinas como secado por aspersión, secado por enfriamiento, coacervación, gelación, evaporación de solventes, expansión supercrítica, polimerización interfacial, lecho fluidizado, gelación, polimerización de emulsión y extrusión (Nesterenko *et al.*, 2013b). El secado por aspersión es un proceso que consiste en la conversión de la alimentación en un estado fluido en forma de partículas mediante la aspersión de la alimentación

en un medio en estado gaseoso (Cal and Sollohub, 2010). El material encapsulado se denomina fase interna, corazón ó relleno, y el material que lo recubre se le llama material de pared, concha, membrana ó recubrimiento (Gibbs *et al.*, 2012). Las microesferas formadas son pequeñas vesículas cuya medida puede variar, la medida de las partículas formadas por encapsulación se clasifican como: macro ($<5000 \mu\text{m}$), micro ($1.0\text{-}5000 \mu\text{m}$) y nano ($<1.0 \mu\text{m}$) (Jafari *et al.*, 2008). Dentro de este grupo se incluyen las *microesferas*, que son sistemas vesiculares en los que el compuesto activo está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica; y las *Microesferas* que son sistemas matrices en los que el compuesto activo está disperso en la partícula. Las *nanopartículas* son sistemas poliméricos submicrónicos ($< 1 \text{ mm}$). De acuerdo con el proceso empleado para preparar nanopartículas, pueden obtenerse *nanocápsulas* o *nanoesferas*, éstas son las equivalentes morfológicas de las microesferas y de las *Microesferas*, respectivamente (Saéñz *et al.*, 2004).

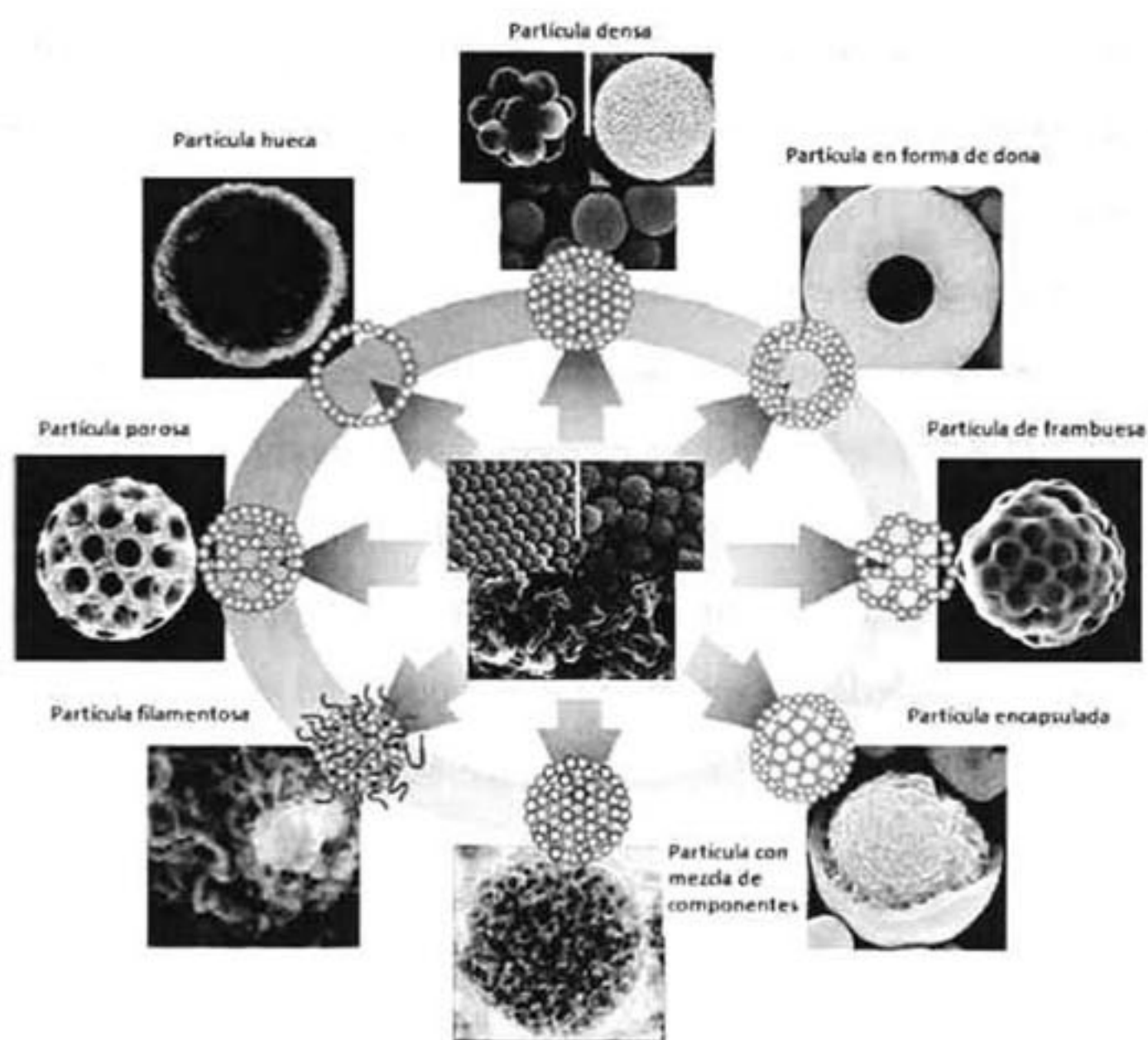


Figura II. 2. Morfología de microesferas (Nandiyanto and Okuyama, 2011).

El secado por aspersión es la técnica de microencapsulación más común utilizada en la industria alimentaria. La técnica de secado por aspersión para producir sabores microencapsulados fue descubierto por Boake Roberts en 1937, cuando añadió acetona accidentalmente al puré de tomate mientras los secaba por aspersión, esto

ayudó a mantener el color y el sabor del tomate (Reineccius 2006). Mediante esta técnica se han encapsulado vitaminas, minerales, colorantes, grasas, compuestos de aroma, oleorresinas y enzimas.

II.2.1 Proceso de secado por aspersión (Spray Drying)

En la **Figura II. 3**, se muestra el diagrama de un secador por aspersión. Un Spray es generado mediante el aumento del área superficial del mismo al ser atomizado. El área superficial antes del rompimiento en gotas, es la contenida en la manguera de donde emerge y el área superficial después de la atomización es la suma del área superficial de todas las gotas resultantes. El proceso consta principalmente de tres etapas: atomización, conversión de rocío a partícula y recolección de partículas. La atomización, consiste en la dispersión de un precursor que es alimentado en un equipo específico para la conversión a gotas. La conversión de rocío a partícula, es cuando la fuerza del líquido excede la fuerza de tensión superficial, el líquido es empujado hacia a fuera y forma gotas. Recolección de partículas, una vez que el producto está seco como un polvo de flujo libre, este debe ser separado del gas de secado, el cual ahora está frío y contiene el líquido evaporado. Los polvos gruesos son fácilmente colectados directamente del fondo del cono de la cámara de secado. En este arreglo los gases de secado empleados salen a través de un ducto de salida situado al centro del cono. La inversión del flujo del gas permite que la fracción más grande del polvo se coloque en el cono, y resbale hacia la conexión inferior equipada, a menudo de una bolsa de aire.

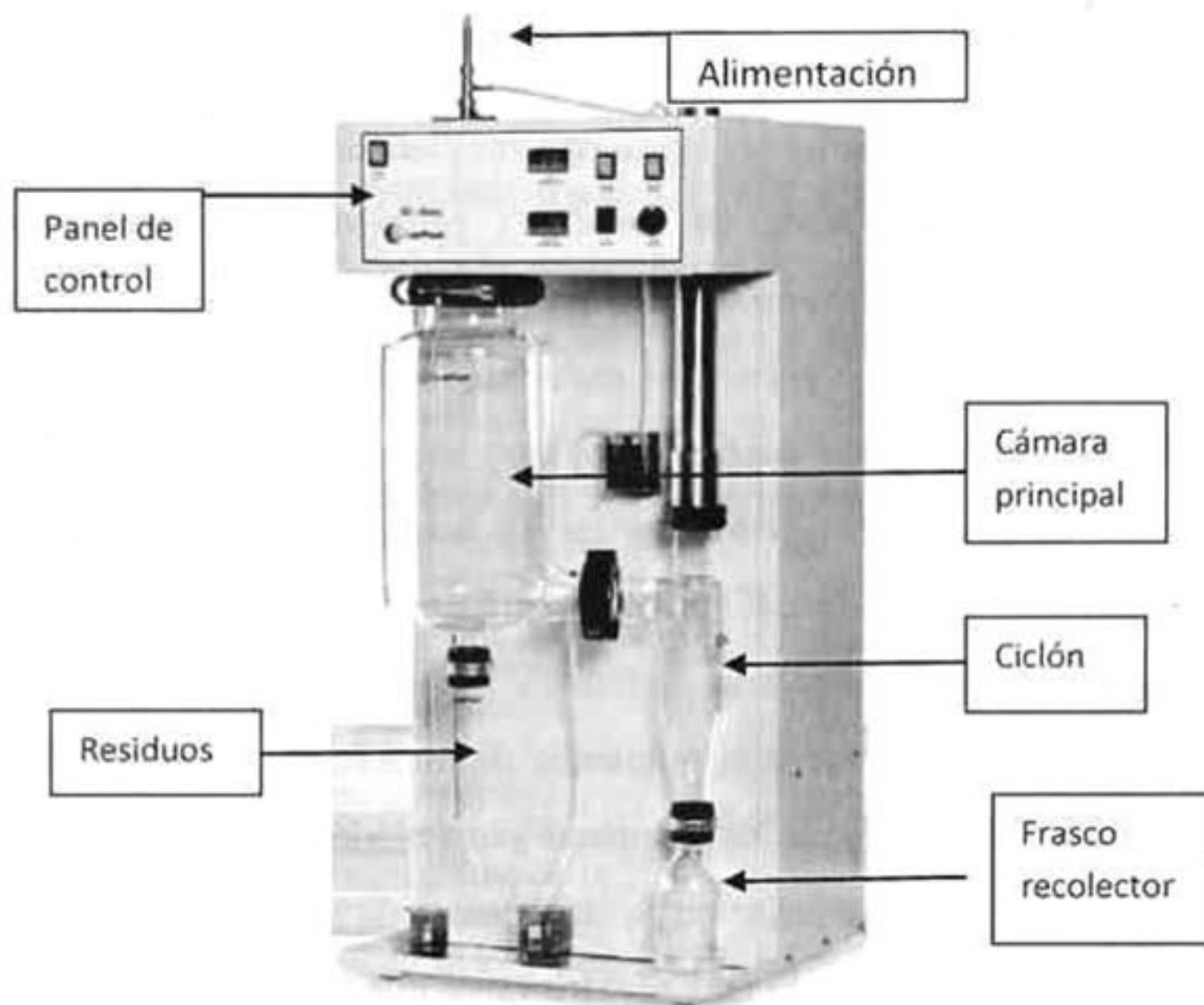


Figura II. 3. Diagrama del Secador por Aspersión Lab-Plan SD-03.

II.2.2 Agentes encapsulantes utilizados en la microencapsulación

El paso más importante en la encapsulación de cualquier compuesto bioactivo mediante secado por aspersión, es la selección del material de pared adecuado que debe formar una película delgada y continua que debe proteger el núcleo del deterioro. El material debe ser de bajo costo, debe ser insípido y debe ser estable durante almacenamiento. Es deseable que el material de pared tenga una alta solubilidad, alta emulsificación, de baja viscosidad a altas concentración de sólidos, baja higroscopicidad, de fácil liberación y de altas eficiencias de microencapsulación. (Lee *et al.*, 2003).

Goma arábiga

Es uno de los agentes encapsulantes más utilizados en el secado por aspersión. Es un exudado natural del tronco y las ramas de las plantas de la familia Acacia. Es uno de los materiales de la pared más preferidos, porque presenta buenas propiedades emulsificantes y es mejor que otras gomas, como la de mezquite (Beristain and Vernon-Carter, 1994). Debido a su baja producción (300 g / planta / año) y elevado costo, se ha buscado sustituir por otros materiales.

Almidones modificados

Los almidones modificados presentan propiedades similares a las de la goma arábica, en su estado nativo no presentan propiedades emulsificantes. En la microencapsulación de flavonoides se han utilizado almidones nativos como: el almidón de maíz, papa, y yuca. Sin embargo, la retención de pigmentos en los almidones nativos aumenta cuando éstos son modificados por hidrólisis ácida ó modificación química. Por ejemplo a las 16 semanas de almacenamiento a una humedad del 32 % el almidón de maíz presentó una retención de pigmentos del 79.7 % y en almidón ceroso de maíz fosfatado de 84.5 % (Cai y Corke, 2000), la acetilación del almidón mejoró la eficiencia de un 47 % a un 61 % (Robert *et al.*, 2005). El almidón succinatado tiene buenas propiedades emulsificantes debido a su carácter anfifílico, por ejemplo: en la encapsulación de clorofila éste material es mejor que la goma arábica y la maltodextrinas ya que prolonga su vida media a 462 días (Porrarud y Pranee. 2010), éste tipo de almidón no ha sido utilizado en la encapsulación de antocianinas.

Maltodextrinas

Las maltodextrinas son el resultado de la hidrólisis del almidón, éstas presentan un grado de dextrosa equivalente (DE) menor a 20 y contienen una mezcla de carbohidratos de una amplia distribución de peso molecular. Las maltodextrinas han sido utilizadas en la microencapsulación de componentes alimenticios como grasas, aceites, vitaminas, minerales y colorantes. En la microencapsulación de antocianinas presentan eficiencias de encapsulación mayores al 95 % y son mejores que los almidones debido a que son más solubles en agua y tienen grupos hidroxilo que pueden interaccionar con los OH- de las antocianinas, son muy estables a temperaturas de 70 °C, sin embargo, son muy higroscópicas y tienen que ser almacenadas a bajas humedades relativas ya que la humedad provoca la degradación de las antocianinas. La eficiencia de en encapsulación antocianinas de maíz negro fue de 95.2 % con el uso de maltodextrinas (Yu-bin *et al.*, 2011).

Proteínas

En la encapsulación de antocianinas, el uso de proteínas tiene mayores ventajas que las maltodextrinas como por ejemplo; para la encapsulación de jugo de

frambuesa la cantidad de material de pared utilizado fue de 1 % de proteína de suero de leche y de maltodextrinas es de un 30 %. Fang *et al.*, (2012), explican que se debe a que durante el secado las proteínas tienden a migrar a la superficie de las gotas, quedando éstas en la superficie de la microcápsula (Figura II.4), en cambio con las maltodextrinas se forma una mezcla homogénea de los componentes. La mezcla óptima de proteína de soya con maltodextrinas, es de 3 a 7 respectivamente y la eficiencia de encapsulación fue del 92.48 % (Ying-Chang. 2012).



Figura II. 4. Estructura de microesferas con maltodextrina y proteína.

Las microesferas de proteína no son pegajosas y se reporta un 100 % en la eficiencia de encapsulación y a diferencia de las maltodextrinas, éstas no producen partículas pegajosas. Para encapsular extracto etanólico de granada encapsulado con aislado proteico de soya Robert *et al.*, (2010), Obtuvieron 100 % en la eficiencia de encapsulación.

II.2.3 Mezclas de agentes encapsulantes

La mezcla de goma arábica con maltodextrina presenta mayor retención y estabilidad de antocianinas (Burin *et al.*, 2011). Una mezcla de maltodextrina (60 %) y goma arábica (40 %) se ha usado para la encapsulación de procianidinas de semillas de uva en donde no se observó ningún cambio en el perfil de procianidinas durante la etapa de secado, la eficiencia de microencapsulación fue de alrededor de 85 %, y se mejoró su estabilidad (Zhang *et al.*, 2007). Otro material de pared utilizado con éxito para la encapsulación de antocianinas es la mezcla proteína-lípido (caseinato de sodio y lecitina de soja) para la formación de una emulsión, que se ha utilizado en el secado por aspersion del extracto de semilla de uva (Kosaraju *et al.*, 2008). Chiou y Langrish, (2007) introdujeron fibra de cítricos como agentes encapsulantes para secado por aspersion de antocianinas de jamaica (*Hibiscus*

sabdariffa L.). Los resultados demostraron que las fibras de frutas naturales pueden ser utilizadas para reemplazar materiales pegajosos. La eficiencia de encapsulación puede ser maximizada mediante la elección correcta de los parámetros de secado por aspersión incluyendo las temperaturas de entrada y salida de secado de aire, el tipo y las condiciones de atomización. De acuerdo con Liu *et al.* (2004), la temperatura del aire de entrada óptima para la microencapsulación de antocianina fue de 120 °C y la temperatura del aire de salida fue de 80 °C.

En el **Cuadro II. 1**, se muestran las condiciones experimentales que han sido utilizadas para la microencapsulación de antocianinas. La cinética de degradación y la estabilidad del color de las microesferas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) fueron estudiadas por Idham *et al.* (2012). En el estudio se utilizaron diferentes materiales: maltodextrina, goma arábica, una mezcla de maltodextrina y goma arábica y almidón soluble. La estabilidad de los pigmentos fue evaluada a tres diferentes temperaturas (4, 25 y 37 °C) durante 105 días. Se observó que los cuatro tratamientos ayudaron a una mayor estabilidad de las antocianinas en comparación que los pigmentos sin encapsular después del almacenamiento y que la mezcla de goma arábica con maltodextrina fue el mejor tratamiento.

1 **Cuadro II. 1. Descripción general de los procesos de microencapsulación de antocianinas**

Fuente de antocianinas	Material de pared	T, °C	T, °C	Flujo	EE %	Referencia
zanahoria	maltodextrinas [Stardri 10 (10DE), Glucodry 210 (20-23DE) y MDX 29 (28-31 DE)]	160,180, 200	107±2, 118±2, 131±2	5 ml/min	NP	(Ersus y Yurdagel, 2007)
Garcinia indica	maltodextrinas de varios tipos (DE 06, 19, 21, y 33), goma acacia y fosfato tricálcico.	150	80	NP	NP	(Nayak y Rastogi, 2010)
uva	Maltodextrinas, maltodextrinas/c ciclodextrina y maltodextrinas/goma	150	50	NP		Burin <i>et al.</i> , 2011.
<i>Bactris guineensis</i>	MD (DE 19-20)	120	80	10		Osorio <i>et al.</i> , 2010.
Jamaica	MDX, goma arábica, almidón y combinación de MDX y goma arábica, MDX (DE20) y ácido ascórbico	150	100	NP		Iham <i>et al.</i> , 2011
Pulpa de papa morada	fibras cítricas	200	85± 4	8.8		Ahmed <i>et al.</i> , 2010.
Açaí	MDX (DE10, DE20) Almidón de tapioca	140 ± 2	78 ± 2	15g/min		Chiou y Langrish, 2007. Tonon <i>et al.</i> , 2010

Berberis	Maltodextrina, β ciclodextrina, goma acacia	160	80	NP	90-95	(Huang y Yang, 2011)
Opuntia stricta	Jarabe de glucosa (DE 29)	160	variable : 50-68	0.72 l/h	NP	(Obón <i>et al.</i> , 2009)
arándanos	Mezclas de proteína de soya (SPI)-maltodextrina y β -ciclodextrina-	120	80	400r / h	92.48	(Ying-chang, Chun-mao, Xian-jun, Yong, y Na2I, 2010)
bayas	maltodextrinas DE 20	230	150	10 mL/min	NP	(Olaya, Castano, y Garzon, 2009)
Clitoria	Hidroxi propil metil celulosa (HPMC) y gelatina	130	80	10 ml/min	NP	(Tantituvanont <i>et al.</i> , 2008)
Granada	maltodextrina (MD) y proteína de soya	140 to 160 \pm 5	100-140 \pm 5	10mL min):	SPI= 35.8,100 %	(Robert <i>et al.</i> , 2010)
Prontocianinid as	goma arábica y maltodextrin	180	88	NP	88.84	(Lianfu, Yanshan, y Dehua, 2006)
Achiote	quitosan	180 \pm 5	100 \pm 5	NP	NP	(Parize <i>et al.</i> , 2010)
Jamaica-Jugo de piña	Tres diferentes maltodextrinas DE 10 concentraciones (3 %, 5 % y 10 % w/w)	140, 160, 180 y 200	80	NP		(Osman y Endut, 2009)
Tamarillo	maltodextrina DE 20	230	150	10 mL/min	NP	(Osorio <i>et al.</i> , 2012)

2 Fuente: Huang, J. y L. Yang, (2011). NP: no presentado.

II.2.4 Factores que influyen en el procesamiento

Efecto de la temperatura

Para tener una mayor retención de antocianinas, se recomienda trabajar con una temperatura de entrada de 170 °C (Moreira *et al.*, 2010), ya que a temperaturas elevadas de secado por aspersión, existe una mayor degradación de pigmentos, por lo que no es recomendable utilizar temperaturas mayores a 180 °C (Cai y Corke, 2000, Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011), en cambio, las microesferas producidas a bajas temperaturas, presentan aglomeraciones en las paredes del secador debido a sus altos contenidos de humedad (Quek *et al.*, 2007).

Efecto de la concentración de sólidos

La estabilidad de las antocianinas también se ve afectada por la concentración de sólidos en la alimentación del secador, a un mayor contenido, se disminuye la velocidad de degradación de las antocianinas (Cai y Corke, 2000) y además favorece la productividad, sin embargo, una alta concentración de sólidos produce altas viscosidades en el secador y puede provocar la adhesión de material encapsulante en la cámara de secado.

Material de pared empleado para la encapsulación de antocianinas

Se ha investigado la microencapsulación de pigmentos naturales con el fin de ser usados como colorantes y/o como alimentos funcionales. Con lo que respecta al uso de colorantes naturales; por ejemplo, para ser empleados en la elaboración de cosméticos, Ge *et al.*, (2009) extrajeron pigmentos de *Rosa hybridum* mediante un proceso de microondas y los encapsularon en cera de abeja con ácido esteárico (1:1) estos autores observaron que gracias a la encapsulación hubo un aumento en la estabilidad de los pigmentos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. También se ha extraído y encapsulado betalainas de betabel con maltodextrina (Azeredo *et al.*, 2007), a fin de ser introducida en yogurt. Se han elaborado también por extrusión, cereales coloreados para desayuno con pigmentos naturales de frutos (Camire *et al.*, 2007). Además de servir como colorantes naturales, también se ha visto que presentan actividad antioxidante, como es el caso de la tuna que contiene betalainas, carotenoides y polifenoles, por lo que su encapsulación con maltodextrina

e inulina (Saénz *et al.*, 2009) puede ser beneficioso en su incorporación en alimentos funcionales.

II.3 Generalidades del almidón

El almidón consiste de gránulos, parcialmente cristalinos e insolubles en agua a temperatura ambiente y son la principal forma de almacenamiento de energía de las plantas. De acuerdo a su fuente botánica pueden ser de diversa forma y tamaño, la forma puede ser redonda, elíptica, ovalada, lenticular o poligonal. El tamaño de los gránulos de almidón de arroz y amaranto son los más pequeños, con aproximadamente 1-3 μm y los más grandes son los de papa y yuca con un diámetro aproximado de 50-100 μm (Hoover, 2001). Los gránulos pequeños de almidón pueden formar agregados esféricos porosos mediante la tecnología de secado por aspersión y son utilizados como agentes acarreadores al rellenar su porosidad con materiales de valor agregado (Lindeboom y Tyler, 2003)

Los almidones se pueden clasificar en diferentes grupos de acuerdo al contenido de amilosa, éstos son: cerosos, 1- 2 %; normales, 17-24 %; y alto contenido con 70 % o más (Moore *et al.*, 1984). El almidón de maíz normal contiene 24 % de amilosa y 76 % de amilopectina mientras que, el almidón de papa tiene 20 % de amilosa y 80 % de amilopectina, la yuca tiene solamente 14 % de amilosa (Alvis *et al.*, 2008), la jícama aproximadamente 23- 25 % (Galván-Mendoza *et al.*, 2002), el maíz ceroso y el arroz integral ceroso no contienen virtualmente amilosa (Wolfrom y Khadem, 1965).

II.3.1 Componentes del almidón

El gránulo de almidón consiste de dos estructuras poliméricas de glucosa denominadas amilosa y amilopectina, además lípidos, proteínas, agua y iones minerales que pueden encontrarse en la matriz del gránulo ó formar complejos específicos con el polímero de almidón (Madruga *et al.*, 2014). La proporción de amilosa y amilopectina en un determinado almidón, determina las propiedades del mismo.

La amilosa es un polímero lineal que consiste de la unión de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos $\alpha\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)}$, como se aprecia en la **Figura II.5**. Las

unidades de glucosa se encuentran en la forma de alfa-D-glucopiranososa y tienen la facilidad de adquirir una conformación helicoidal en la que cada vuelta se compone de un anillo de seis unidades. También presenta entre un 0.3-0.5 % de enlaces α -D-(1 \rightarrow 6) formando ramificaciones (Greenwood 1964, French 1973, Banks y Greenwood, 1975, Takeda *et al.*, 1990). El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno y en el exterior los grupos hidroxilo.

La amilopectina es una molécula larga y altamente ramificada (**Figura II. 5.**), en la cual, las moléculas lineales de D-glucosa se encuentran unidas mediante enlaces α -(1 \rightarrow 4) que se encuentran interligadas entre un 5-6 % de enlaces glucosídicos α -D-(1 \rightarrow 6), formando una estructura ramificada.

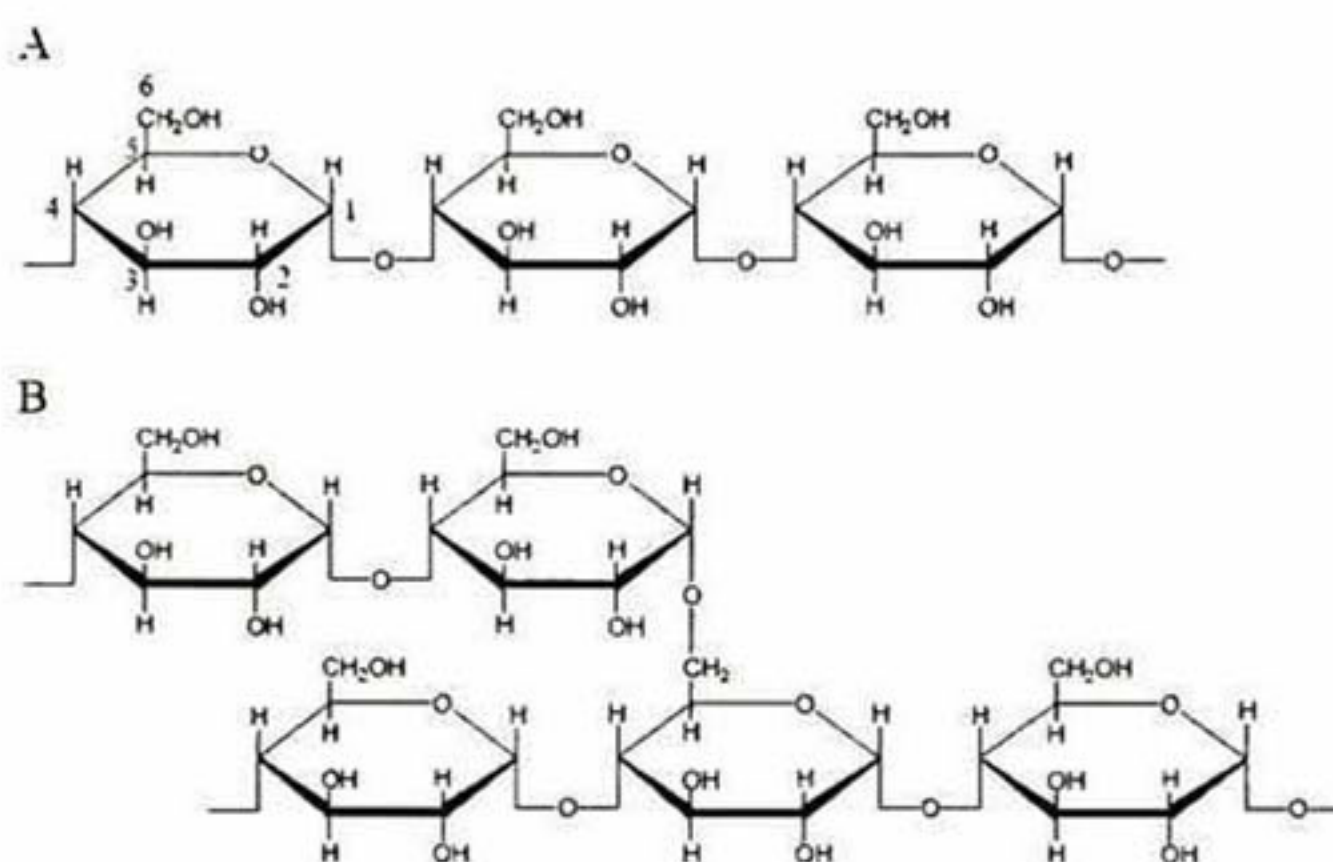


Figura II. 5. Estructura química de la amilosa (A) y de la amilopectina (B).

II.3.2 Fuentes de obtención

El almidón, al ser sintetizado en diferentes tejidos y órganos de las plantas puede aislarse de diferentes fuentes, las cuales se clasifican en cinco grupos (**Cuadro II. 2**), tubérculos y raíces, cereales, leguminosas, frutos y el último grupo comprende a los almidones obtenidos de fuentes botánicas que están sujetas a una mutación genética que alteró al almidón (ceroso y alto en amilosa) (Huang, 2006).

Cuadro II. 2. Fuentes de almidón

Tubérculos y raíces	Cereales	Legumbres	Frutos	Mutantes
Papa	Maíz	Chícharo	Mango	Maíz ceroso
Yuca	Trigo	Garbanzo	Plátano	Amilomaíz
Camote	Arroz	Lenteja	Yaca (Jackfruit)	Sorgo ceroso
Ñame	Sorgo	Frijoles	Pandan (tipo palma)	Arroz ceroso
Malanga				Trigo ceroso
Taro				Papa cerosa

Fuente:Huang, 2006.

II.4 Almidones modificados

Se ha denominado almidón modificado al almidón que ha sufrido una alteración en sus características físicas o químicas con la finalidad de mejorar sus propiedades funcionales (Singh *et al.*, 2007). El término “derivado de almidón” incluye a aquellas modificaciones que cambian la estructura química de algunas de las unidades α -D-glucopiranosil (unidad de anhidro glucosa, UAG) en las moléculas del almidón nativo (Rutenberg y Solarek, 1984). En el **Cuadro II.3.**, se muestra un resumen de las modificaciones del almidón. La modificación física, consiste en los tratamientos de calor y humedad, lo cuales están asociados con la disminución de la hidrólisis enzimática de la α -amilasa pancreática, se ha observado que al realizar varios ciclos de autoclave/enfriamiento, hay un aumento de almidón resistente por encima del 40 % (Pomeranz, 1992) y además son destruidas las estructuras granulares del almidón, formándose conglomerados porosos que con tratamientos repetitivos, pasan a ser estructuras más compactas. También se han combinado los tratamientos físicos con los enzimáticos, como lo llevó a cabo Berry (1986), quien obtuvo de un 32 a 46 % de almidón resistente al desramificar almidón ceroso con pululanasa, seguido con un tratamiento térmico. El tipo más común de modificación de almidón es el tratamiento con pequeñas cantidades de reactivos químicos, debido a su alta eficiencia y a que brinda la posibilidad de controlar variables que influyen en las propiedades del material (Thomas y Atwell, 1999). Este tipo de modificación cambia las propiedades funcionales del almidón, se lleva a cabo por reacciones que involucran los grupos hidroxilos (OH) del polímero (Rutenberg y Solarek, 1984);

estos almidones tratados se pueden obtener aplicando estos procesos de modificación separadamente o en combinación (Thomas y Atwell, 1999). Las modificaciones químicas se dividen en métodos de derivación (entrecruzamiento, estabilización y la adición de grupos funcionales) y métodos de conversión (hidrólisis, oxidación, dextrinización y conversión); pueden ser monofuncionales, polifuncionales, de doble derivación, oxidativas o hidrolíticas (Singh *et al.*, 2007).

Las propiedades físicas, químicas y funcionales del almidón modificado son influenciadas por los grupos introducidos, así como por el grado de sustitución (GS), el cual se define como una medida del número de grupos OH de cada Unidad Anhidra de Glucosa (UAG) que son sustituidos por grupos químicos. Las UAG's del almidón tienen tres grupos OH disponibles para ser sustituidos en las posiciones C2, C3 y C6; por lo que el GS máximo posible es de tres (Rutenberg y Solarek, 1984). Las principales modificaciones químicas más comunes **Cuadro II. 3** que se realizan en la industria son: la derivación vía formación de éter o éster, la oxidación, la hidrólisis de los enlaces glucosídicos y la dextrinización.

Cuadro II. 3. Modificaciones químicas y físicas de los almidones

Modificación	Tipo	Propiedades
Física	-Tratamiento con humedad y calor -Pregelatinización (Widodo and	Aumenta la solubilidad del almidón en agua fría
Enzimática	-Hidrólisis parcial (Rodríguez y	Reduce el peso molecular
Química		
Conversión	-Hidrólisis ácida(Falade and Ayetigbo, -Tratamiento alcalino -Oxidación (García-Tejeda <i>et al.</i> , -Piroconversión-Dextrinización	Reduce el peso molecular disminuye la viscosidad blanquea el almidón
Derivación	-Eterificación- -Esterificación-Acetilación, -Entrecruzamiento-almidón fosfatado -Modificación dual (Deetae <i>et al.</i> ,	Reduce la retrogradación, estabiliza la molécula para

II.4.1 Extrusión

La extrusión se ha convertido en un método muy importante para el procesamiento de alimentos en base de almidón, como por ejemplo, la producción de almidones pregelatinizados en pastas (Asp y Björck, 1989; Li y Vasanthan, 2003), modificaciones químicas como; la oxidación de almidones de diversas fuentes para impartirles mayor solubilidad y menor viscosidad (Wing y Willett, 1997), fosfatación para el aumento del índice de absorción de agua, darle resistencia a las altas temperaturas, disminuir la cohesividad del gel (Nabeshima y Grossmann, 2001) que son características deseables para su utilización como agente aglutinante de medicamentos para disminuir su liberación (O'Brien y Wang, 2009), hidroxipropilación para dar más estabilidad a alimentos que se congelan y descongelan (De Graaf y Janssen, 2002).

La extrusión es un proceso atractivo para encapsular una gran variedad de sustancias bioactivas en matrices de almidón (Yilmaz, *et al.*, 2001). Para la encapsulación de sustancias hidrofóbicas como fragancias, saborizantes e insecticidas se han utilizado emulsificantes como los almidones succinatados (Bhosale y Singhal, 2006). Lengerich (1990) observó que durante la extrusión ocurre la dextrinización del almidón, es decir la producción de cadenas cortas y esto se debe a las altas temperaturas, al aumento en la velocidad del tornillo y a la baja velocidad en la alimentación. Además, el contenido de agua afecta la gelatinización del almidón y generalmente el aumento de su proporción disminuye la viscosidad.

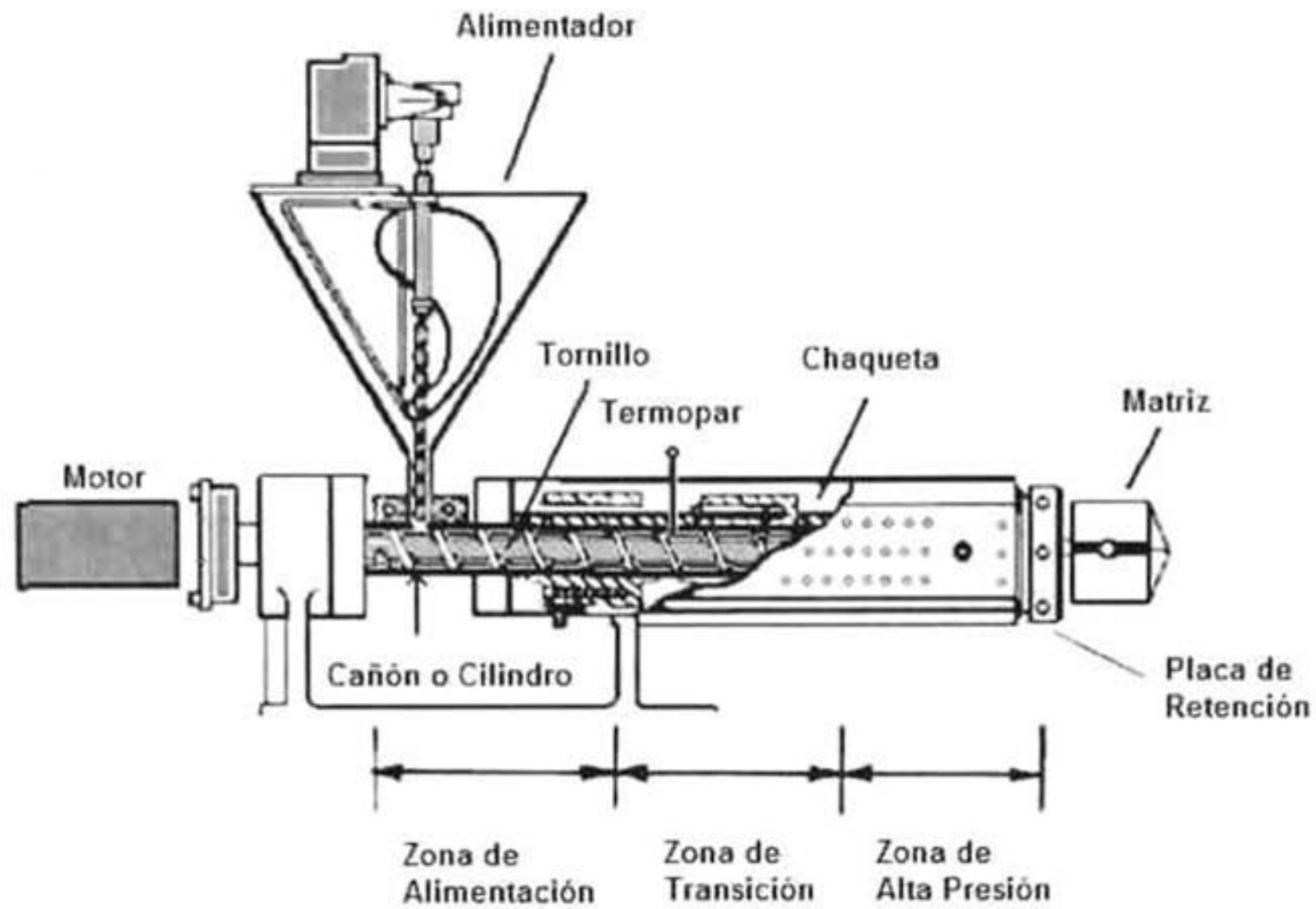


Figura II. 6. Diagrama general de un extrusor

Descripción del proceso de extrusión

La extrusión, se considera un proceso de alta temperatura y corto tiempo. Un extrusor (**Figura II. 6.**) contiene los siguientes elementos básicos:

1. Tolva de alimentación
2. Un barril liso o acanalado que puede ir provisto de chaquetas de calentamiento o enfriamiento.
3. Uno o dos tornillos que giran ajustadamente dentro del barril. Pueden ser de una sola pieza o compuestos de secciones intercambiables.
4. Una boquilla de descarga
5. Un motor que hace girar los tornillos

En la boquilla de descarga, puede colocarse un dado, que es el aditamento de metal que se encarga de formar el material termoplástico. Se divide en tres partes: la sección de adaptación, en donde se ensambla a la boquilla de salida del extrusor; la sección de distribución, que se encarga de moldear el material; y la zona del dado, que mantiene constante la sección transversal del canal de flujo antes de salir de los labios del dado (Wai-Bun y Jinchyau, 2003). El extrusor, puede dividirse en tres ó

más zonas de procesamiento: zona de alimentación, zona de formación y la zona de salida. La zona de alimentación generalmente tiene canales profundos que reciben la materia prima. Los preacondicionados o materiales secos entran a esta zona y son arrastrados a la zona de formación. En este punto se puede adicionar agua para ayudar a la formación de una masa y mejorar la transferencia de calor en el barreno del extrusor. En la zona de mezclado el material incrementa su densidad debido al agua y al vapor generado (Díaz, 2001).

Las condiciones de operación utilizadas durante el proceso de extrusión, tales como la temperatura, la velocidad y geometría del tornillo, la proporción de amilosa/amilopectina presente en el almidón y el contenido de humedad de la mezcla, repercuten directamente en la fragmentación de los gránulos de almidón. El parámetro más importante en la extrusión, es la viscosidad del material fundido en la zona de formación, ya que éste controla las propiedades del extrudido, influye en el transporte del material y en la presión generada en ésta zona. Se ha reportado que a mayor temperatura del dado en la zona de formación, existe un aumento en la gelatinización del almidón, que provoca también un incremento en la viscosidad (Li, *et al.*, 2004).

II.4.2 Fosfatación

Se caracteriza por formar pastas de buena consistencia, claridad, estabilidad a bajas temperaturas y buenas propiedades de emulsificación. Woo y Seib (2002), fosfataron almidón de trigo usando mezclas de TMFS (trimetafosfato de sodio) y TPFS (tripolifosfato de sodio) en proporciones de 1:99 a 99:1, encontró que al incrementar la proporción de TMFS éste presentó una mejor fosfatación del almidón hasta un 0.32 % de fósforo y el contenido de AR (almidón resistente) también incrementó hasta 75.6 %. Por lo tanto, ellos concluyen que el TMFS presentó una mejor fosfatación del almidón que el TPFS, incrementó la resistencia a la digestión enzimática.

Los almidones fosfatados a un pH menor a 7, generan pastas claras con consistencia fibrosa, lo cual indica la presencia de almidón monofosfato con poco o sin enlaces de entrecruzamiento, por otro lado, los fosfatados a pH mayores de 10 producen pastas con poca consistencia y claridad. Esto se debe a un excesivo entrecruzamiento, sin

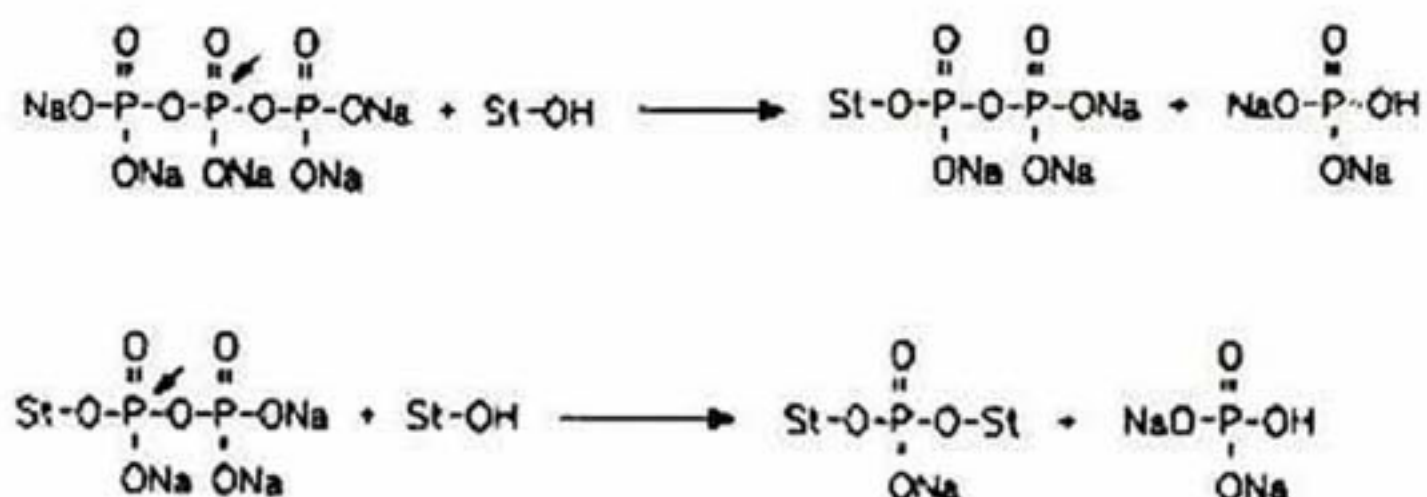
embargo, se requiere un pH alcalino para el entrecruzamiento.

El tripolifosfato tiene 5 hidrógenos ionizables, a pH mayores de 10, la molécula se encuentra con carga negativa y forma una densa protección, que puede deberse a los ataques nucleofílicos de la molécula. La alta repulsión de la electronegatividad de los grupos hidroxilo del almidón por el tripolifosfato, traen como consecuencia un bajo grado de fosfatación al pH alcalino. A altas temperaturas, los grupos hidroxilo del almidón se encuentran ligeramente ionizados por las condiciones alcalinas y pueden atacar el fosfato central, que tiene sólo un grupo hidroxilo ionizado y los demás fosfatos están completamente ionizados. En ese momento se forma el almidón pirofosfato, que posteriormente puede reaccionar con otro grupo hidroxilo del almidón para producir dialmidón fosfato. Esto se observa en la **Figura II. 7**.

A un pH < 9, los grupos fosfato terminales del tripolifosfato se encuentran protonados, entonces pueden reaccionar mediante un mecanismo unimolecular para producir monometafosfato. Éste reacciona rápidamente con los hidroxilos del almidón, para dar almidón monofosfato. De la misma manera a un pH menor de 9, disminuye el entrecruzamiento.

La reacción inicial entre el trimetafosfato de sodio (TMFS) y el almidón, puede estar involucrada en la formación de un anillo abierto de STMP con la formación del almidón tripolifosfato (TPF). La estructura es similar a la del ATP, de donde se sabe que bajo condiciones alcalinas se hidroliza en pirofosfato y en adenosin monofosfato. A un pH > 8, el almidón puede reaccionar de forma similar con el almidón trifosfato en el fosfato del enlace α -fosfato para dar dialmidón fosfato y pirofosfato. La reacción se muestra en la **Figura II. 7**.

A un pH>10



A un pH<9

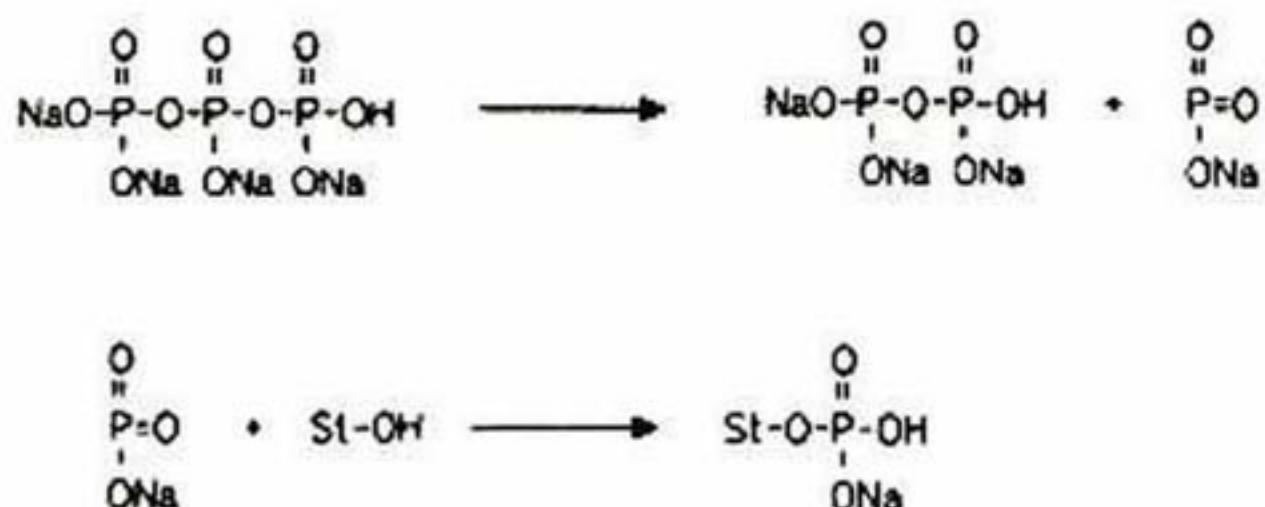


Figura II. 7. Mecanismo propuesto en la fosfatación del almidón con tripolifosfato de sodio (fuente: Lim y Seib, 1993).

II.4.3 Acetilación

La acetilación es una modificación química que se lleva a cabo por una reacción de esterificación en el esqueleto del almidón, sustituyendo los grupos OH por grupos químicos bloqueadores (CH₃-C=O) que propician un entorno hidrofóbico en el almidón, debido a esto se les clasifica también como almidones esterificados (Rutenberg y Solarek, 1984; Wurzburg, 1986). Las reacciones que ocurren durante la acetilación son ilustradas en la **Figura II. 8**; en la reacción principal, el almidón es acetilado con anhídrido acético y con una base como catalizador. La sustitución se

lleva a cabo por un mecanismo de adición y eliminación; además, los grupos OH libres de la UAG (unidades anhidras de glucosa) presentan diferente reactividad. El grupo OH primario situado en el C6 es más reactivo, ya que se localiza en el exterior de la molécula, teniendo mayor contacto con el anhídrido acético y acetilándose con mayor facilidad que los grupos OH en posiciones secundarias C2 y C3 que se encuentran localizados en el interior de la molécula, formando puentes de hidrógeno con las UAG cercanas (Rutenberg y Solarek, 1984; Huang, 2006). Los almidones acetilados presentan características diferentes con relación a los almidones nativos, presentan menor temperatura de gelatinización (T_g) y el pico de viscosidad máxima es mayor con respecto al almidón nativo, lo cual indica que los almidones acetilados se dispersan más fácilmente que los almidones nativos. La acetilación también incrementa la claridad y estabilidad de los geles que se forman con este almidón y reduce la retrogradación (Rutenberg y Solarek, 1984).

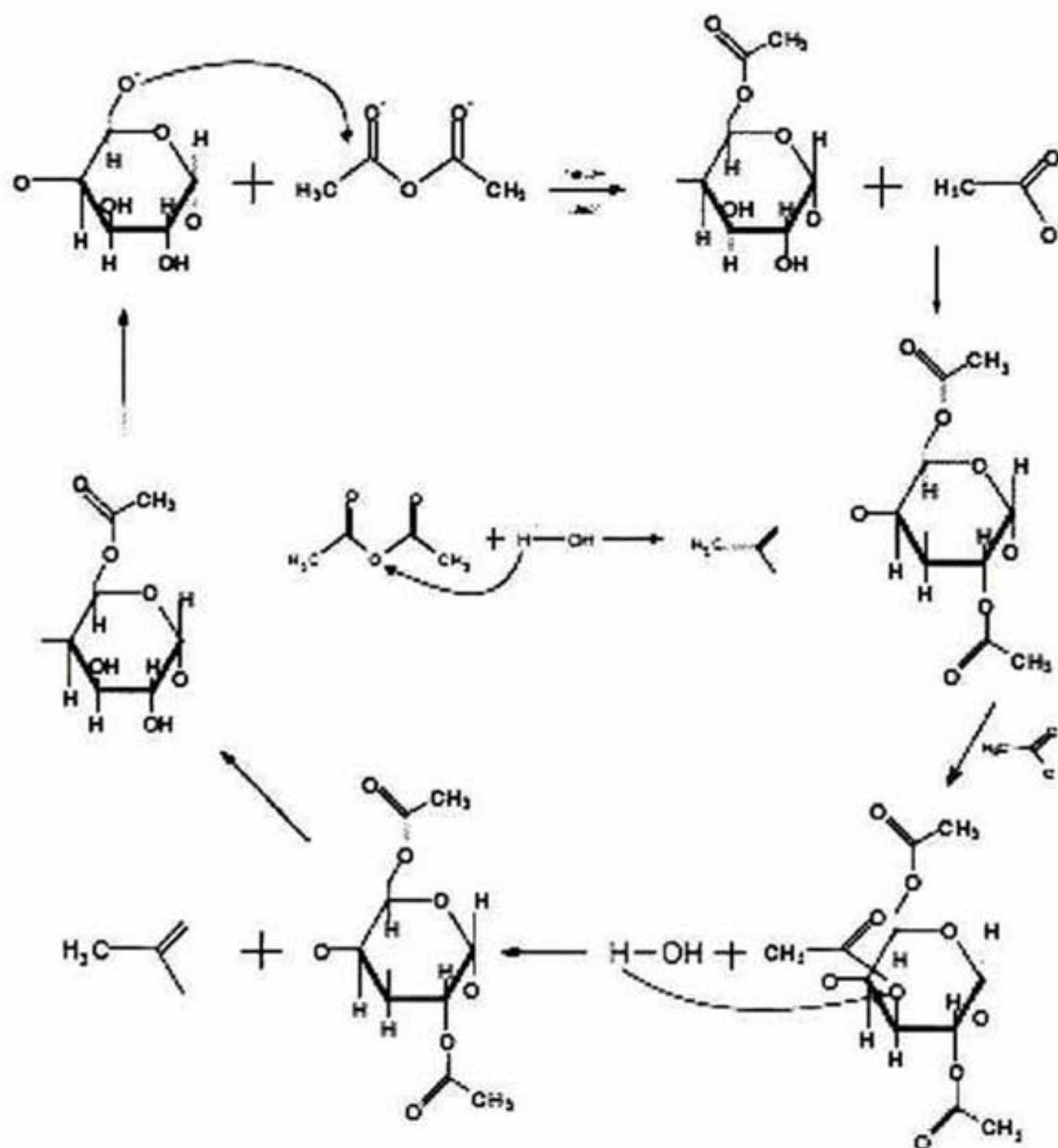


Figura II. 8. Reacciones químicas que ocurren durante la acetilación del almidón.

II.4.4 Succinilación

Se ha realizado la esterificación con anhídridos succínicos como el 1-octenil-anhídrido succínico (*n*-OSA) a una concentración del 3 % (en base seca de almidón), a temperatura ambiente y tiempo de reacción de 2 a 6 horas, posteriormente, se neutraliza la mezcla con HCl. El almidón modificado, se lava con agua destilada 2 ó 3 veces y la última con acetona, terminado lo anterior, se seca en una estufa a 40 °C durante 24 h (Song *et al.*, 2006, Han y BeMiller, 2007). La sustitución le confiere una habilidad emulsificante (Tessler y Billmers, 1996).

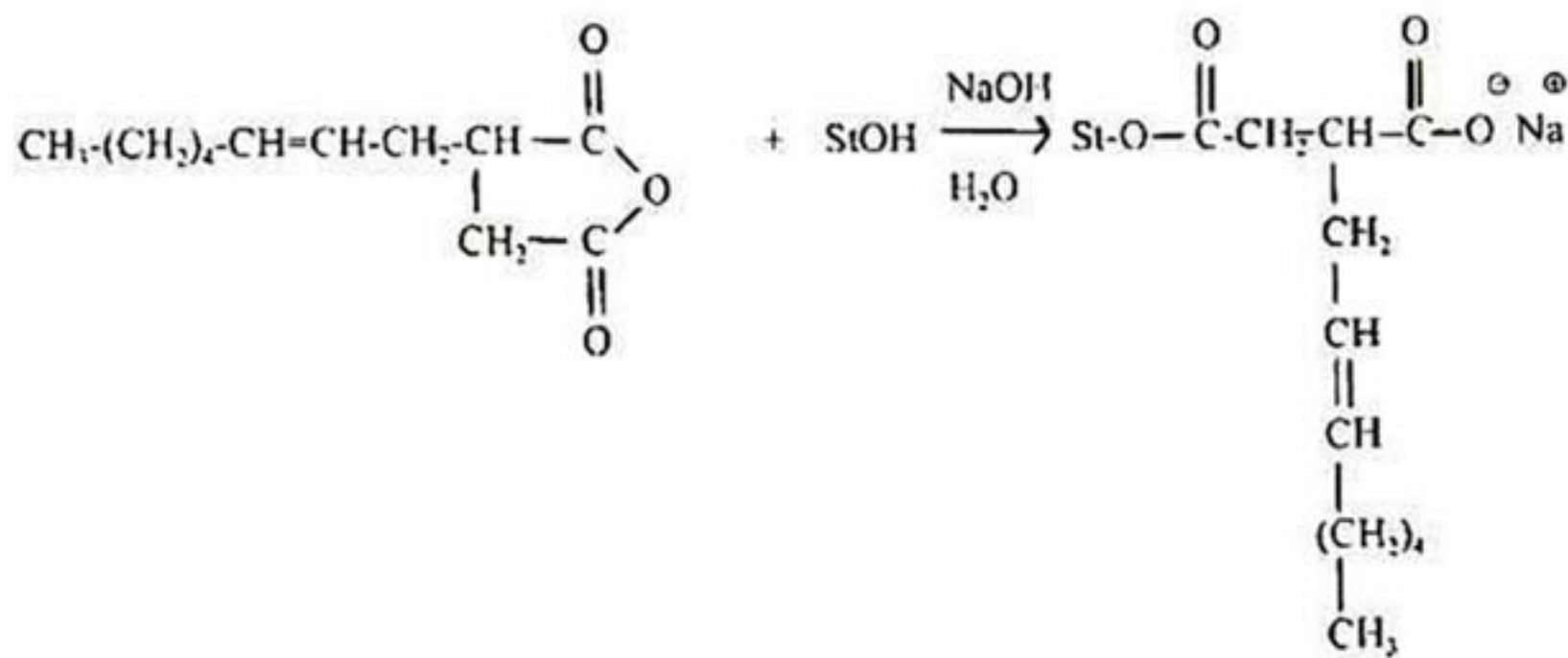


Figura II. 9. Esterificación del almidón con 1-octenil-anhídrido succínico (Song *et al.*, 2006).

La estructura helicoidal de la fracción de amilosa, también permite a estos almidones atrapar físicamente las moléculas de sabor en la emulsión (Zeller *et al.*, 1999). Consecuentemente, en soluciones acuosas en particular, los alquenil succinatos de almidón (*n*-OSA), se han utilizado para estabilizar concentrados de sabor en bebidas, aceite en preparaciones de ensalada, y encapsulación de sabores, fragancias y vitaminas en formulaciones secadas por aspersion (Shogren *et al.*, 2000).

La FDA ha aprobado el tratamiento del almidón con un máximo de anhídrido octenil- succínico del 3 %. Esto corresponde a un grado de sustitución de 0.02. El almidón modificado obtenido mediante este tratamiento se ha reportado que es superior a la goma Arábica en propiedades de emulsificación y en la retención de sabores volátiles durante el secado por aspersion (Reineccius 2006).

II.5 REFERENCIAS

- Alvis, A., Vélez, C. A., Villada, H. S. y Rada-Medoza, M. (2008). Análisis Físico-Químico y Morfológico de Almidones de Ñame, Yuca y Papa y Determinación de la Viscosidad de las Pastas. *Información Tecnológica*; 19: 19-28.
- Aoki H, N Kuze, Y Kato (2002) Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Foods & Food Ingredients Journal of Japan* 199: 41-45.
- Asp, N. G., y Björck, I. (1989). Nutrition properties of extruded foods. In C. Mercier, P. Linko, y J. M. Harper (Eds.), *Extrusion cooking* (pp. 309-434). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Azeredo, H. M., Santos, A. N., Sourza, A. C., Mendes, K. C., y Yrade, M. I. (2007). Betacyanin Stability During Processing y Storage of a Microencapsulated Red Beetroot Extract. *American Journal of Food Technology*, 307-312.
- Bagchi, D., Roy, S., Patel, V., He, G., Khanna, S., Ojha, N., Phillips, C., Ghosh, S., Bagchi, M., Sen, C., 2006. Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 281, 197-209.
- Bakowska-Barczak, A.M., Kolodziejczyk, P.P., 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products* 34, 1301-1309.
- Banks, W. and Greenwood, C. T. 1975. Fractionation of the starch granule, and the fine structures of its components. In: *Starch and its components*. Edinburgh University Press: Edinburgh, UK. pp 5-66.
- Beristain, C., Vernon-Carter, E., 1994. Utilization of mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsion stabilizing agent for spray-dried encapsulated orange peel oil. *Drying Technology* 12, 1727-1733.
- Berry, C. S. (1986). Resistant starch: formation y measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 4: 301-314.
- Bhosale, R., y Singhal, R. (2006). Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn y amaranth starches. *Carbohydrate polymers*, 521-527.
- Breakey J, Reilly C, Connell H. The Role of Food Additives y Chemicals in Behavioral, Learning, Activity, y Sleep Problems in Children. In: Branen A L, Davidson PM, Salminen S, Thorngate III J H, editors. *Food additives*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002. p. 87-88.
- Burin, V.M., Rossa, P.N., Ferreira-Lima, N.E., Hillmann, M.C.R., Boirdignon-Luiz, M.T., 2011. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science Techonoly* 46, 186-193.
- Cai, Y.Z., Corke, H., 2000. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science* 65, 1248-1252.
- Çam, M., İçyer, N.C., Erdoğan, F., 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology* 55, 117-123.
- Camire, M.E., Dougherty, M.P., Briggs, J.L., 2007. Functionality of fruit powders in extruded corn breakfast cereals. *Food Chemistry*. 101, 765-770.

- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T., Meireles, M.A.A., 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International* 44, 499-509.
- Cevallos-Casals, B.A., Cisneros-Zevallos, L., 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*. 86, 69-77.
- Chang, Y.H., Lii, C.Y., 1992. Preparation of starch phosphates by extrusion. *Journal of Food Science* 57 (1), 203–205.
- Chung, C., Sanguansri, L., Augustin, M., 2008. Effects of Modification of Encapsulant Materials on the Susceptibility of Fish Oil Microcapsules to Lipolysis. *Food Biophysics* 3, 140-145.
- Cui L, G Rongqi, D Shuting, J Zhang, L Peng, H Zhang, J Meng, D Shi (2012) Effects of ear shading on the anthocyanin contents and quality of kernels in various genotypes of maize. *Australian Journal of Crop Science* 4:704-710.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., Marín-Arroyo, M., 2013. Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. *Food and Bioprocess Technology* 6, 941-951.
- De Graaf, R. A., y Janssen, L. P. (2002). The Hydroxypropylation of Starch in a Self-Wiping Twin Screw Extruder. *Advances in polymer technology*, 56-67.
- De Pascual-Teresa S, M T Sanchez-Ballesta (2008) Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry reviews* 7:281-299.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chemistry*. 103, 935-943.
- Deetae, P., Shobsngob, S., Varanyanond, W., Chinachoti, P., Naivikul, O., Varavinit, S., 2008. Preparation, pasting properties and freeze–thaw stability of dual modified crosslink-phosphorylated rice starch. *Carbohydrate Polymers*. 73, 351-358.
- Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C.H., Serna Saldivar, S.O., Talcott, S.T., 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research International*. 39, 696-703.
- Dougall D K, D C Baker, E Gakh, M Redus (1997) Biosynthesis and stability of monoacylated anthocyanins. *Food Technology* 15(11):69-71.
- Durst R., Wrolstad R. E. Separation y Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Hybook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley y Sons; 2001. p. 33-45.
- Dziedzic, S. Z. y Kearsley, M. W. (2003). The technology of starch production. In: *Hybook of starch hydrolysis products y their derivatives*, Kearsley, M. W. y Dziedzic, S. Z. Eds. Blackie academic y professional capítulo 1. pp: 6-17.
- Ersus, S., Yurdagel, U., 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. 80, 805-812.
- Falade, K.O., Ayetigbo, O.E., 2015. Effects of annealing, acid hydrolysis and citric acid modifications on physical and functional properties of starches from four yam (*Dioscorea spp.*) cultivars. *Food Hydrocolloids*. 43, 529-539.
- Fang, Z., Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 510-523.
- Fang, Z., Bhandari, B., 2012. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*. 129, 1139-1147.

- French, D. 1973. Chemical y physical properties of starch. *Journal of Animal Science*. 37:1048-1061.
- Galván-Mendoza, R., Vásquez-Barrios, M.E., Martínez-Bustos, F., y Mercado-Silva, E. (2001). Partial characterization of (*P. erosus* and *P. ahipa*). Abstract. Annual Congress IFT-2001, USA.
- García-Tejeda, Y.V., López-González, C., Pérez-Orozco, J.P., Rendón-Villalobos, R., Jiménez-Pérez, A., Flores-Huicochea, E., Solorza-Feria, J., Bastida, C.A., 2013. Physicochemical and mechanical properties of extruded laminates from native and oxidized banana starch during storage. *LWT Food Science and Technology* 54, 447-455.
- Garzón, G.A., Wrolstad, R.E., 2002. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science* 67, 1288-1299.
- Ge, X., Wan, Z., Song, N., Fan, A., Wu, R., 2009. Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. *Journal of Food Engineering*. 94, 122-128.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S.F., Alli I FAU Mulligan,,C.N., Mulligan, C.N., 0202. Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition* JID - 9432922 .
- González-Manzano, S., Pérez-Alonso, J.J., Salinas-Moreno, Y., Mateus, N., Silva, A.M.S., de Freitas, V., Santos-Buelga, C., 2008. Flavanol–anthocyanin pigments in corn: NMR characterisation and presence in different purple corn varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 521-526.
- Greenwood, C. T. 1964. Structure, properties, and amylolytic degradation of starch. *Journal of Food Technology*. 18:138-144.
- Hoover, R. y Ratnayake, W. S. (2002). Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean y pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chemistry*. 78: 489-498.
- Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T. y Harada, N. (1982). Evidence for the self association of anthocyanins in neutral aqueous solution. *Tetrahedron Letters*. 433.
- Huang, J. (2006). Function-structure relationships of acetylated pea starches. Ph. D. thesis Wageningen University. Netherlys.
- Huang, J. y L. Yang, (2006). Microencapsulation of Anthocyanins from Fruits of *Berberis kaschgarica* Rupr. *Food Science*, 2011.
- Hutchings, J. H. (1999). *Food Color y Appearance*. 2nd ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, Inc.
- International food research journal* 17: 1031-1042 (2010). Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment form Pandan leaf. Porrarud, S. and Pranne, A.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., Bhandari, B., He, Y., 2008. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International* 41, 172-183.
- Jurd, L. 1972. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type pigments. In: Chichester CO, Editor. *The Chemistry of Plant Pigments*. New York: Academic Press, p. 123-142.
- Konował, E., Lewandowicz, G., Le Thanh-Blicharz, J., Prochaska, K., 2012. Physicochemical characterisation of enzymatically hydrolysed derivatives of acetylated starch. *Carbohydrate Polymers*. 87, 1333-1341.
- Kosaraju, S.L., Labbett, D., Emin, M., Konczak, I., Lundin, L., 2008. Delivering polyphenols for healthy ageing. *Nutrition & Dietetics* 65, S48-S52.

- Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R.S., 2005. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*. 61, 95-102.
- Kshirsagar, A.C., Singhal, R.S., 2008. Preparation of hydroxypropyl corn and amaranth starch hydrolyzate and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Food Chemistry*. 108, 958-964.
- Lee, J.Y., Park, H.J., Lee, C.Y and Choi, W.Y. 2003. Extending shelf life of minimally
- Li, J. H., y Vasanthan, T. (2003). Hypochlorite oxidation of field pea starch y its suitability for noodle making using an extrusion cooker. *Food Research International*, 381-386.
- Lindeboom, N., R., P. C., y Tyler , R. T. (2003). Analytical, Biochemical y Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke*, 89-99.
- Lopez-Martinez, L.X., Oliart-Ros, R.M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C., Parkin, K.L., Garcia, H.S., 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT Food Science and Technology* 42, 1187-1192.
- Markaris, P., Livingston, G.E., Fellers, C.R., 1957. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation a,b, *Journal of Food Science* 22, 117-130.
- Moreira, G.É.G., De Azeredo, H.M.C., De Medeiros, Maria De Fátima Dantas, De Brito, E.S., De Souza, A.C.R., 2010. Ascorbic acid and anthocyanin retention during spray drying of acerola pomace extract. *Journal of Food Process Preservation*. 34, 915-925.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C.I., Martínez-Bustos, F., (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 91, 380-386.
- Nabeshima, E. H., y Grossmann, M. V. (2001). Functional properties of pregelatinized y cross-linked cassava starch obtained by extrusion with sodium trimetaphosphate. *Carbohydrate Polymers*, 347-353.
- Nayak, C. A., Rastogi, N. K. 2010. Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Drying Technology*, 28, 1396-1404.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V., (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products* 42, 469-479.
- O'Brien, S., Wang, Y., 2009. Effects of shear and pH on starch phosphates prepared by reactive extrusion as a sustained release agent. *Carbohydrate Polymers*. 77, 464-471.
- Obón, J.M., et al., 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*, (2009). 90(4): p. 471-479.
- Olaya, C., M. Castano, and G. Garzon, Stability of anthocyanins from *rubus glaucus* and *solanum betaceum* cav. dark-red strain as affected by temperature, storage and water activity. *Acta Biológica Colombiana*, (2009). 14(3): p. 143-158.
- Ortega, P.; Sánchez, G. F.; Castillo, G. y Hernández, C., Estado actual sobre los maíces nativos de México. En: *Avances en el estudio de los recursos*

- filogenéticos de México. Ortega, R., Palomino, P. G., Castillo, H. F., González G. V. A. y Livera, M. (eds). México. 1991, pp. 161-196.
- Palma-Rodríguez, H.M., Agama-Acevedo, E., Gonzalez-Soto, R.A., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., Bello-Perez, L.A., (2013). Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from different botanical sources. *Starch - Stärke* 65, 584-592.
- Pedreschi, R., Cisneros-Zevallos, L., (2007). Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry*. 100, 956-963.
- Poei-Langston, M.S., Wrolstad, R.E., (1981). Color Degradation in an Ascorbic Acid-Anthocyanin-Flavanol Model System. *Journal of Food Science* 46, 1218-1236.
- Pomeranz, Y. (1992). Research y development regarding enzyme-resistant carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: 63-68.
- Porrarund and Pranee. (2010). Microencapsulation of Zn.cholophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. *International Food Research Journal*. 17: 1031-1042.
- Quek, S.Y., Chok, N.K., Swedlund, P., (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 46, 386-392.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C., (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science Technology*. 45, 1386-1394.
- Rodríguez, S.D., Bernik, D.L., (2014). Flavor release by enzymatic hydrolysis of starch samples containing vanillin–amylose inclusion complexes. *LWT Food Science and Technology* 59, 635-640.
- Rojo, L.E., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M.H., Lila, M.A., Raskin, I., (2012). In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*. 131, 387-396.
- Rutenberg R. W. y Solarek D. (1984). Starch derivatives: Production y uses. En: *Starch Chemistry y Technology*. 2nd Ed. Eds. R.L. Wistler, J. N. BeMiller, E. F. Paschall. Academic Press, New York, EUA. pp. 311-366.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P., (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. 114, 616-622.
- Salinas Moreno, Y., Sánchez, G.S., Hernández, D.R., Lobato, N.R., (2005). Characterization of Anthocyanin Extracts from Maíze Kernels. *Journal of Chromatographic Science* 43, 483-487.
- Shaikh, J., Bhosale, R., Singhal, R., (2006). Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*. 94, 105-110.
- Shih, P., Chan, Y., Liao, J., Wang, M., Yen, G., (2010). Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 598-605.
- Shogren, R.L., Viswanathan, A., Felker, F., Gross, R.A., (2000). Distribution of Octenyl Succinate Groups in Octenyl Succinic Anhydride Modified Waxy Maíze Starch. *Starch - Stärke* 52, 196-204.

- Singh, J., Kaur, L., McCarthy, O.J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal y rheological properties of some chemically modified starches for food application- A review. *Food Hydrocolloids*, 1-22.
- Sondheimer, E., Kertesz, Z.I., (1953). Participation of ascorbic acid in the destruction of anthocyanin in strawberry juice and model systems. *Journal of Food Science* 18, 475-479.
- Spada, J.C., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C., (2012). Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*. 89, 1166-1173.
- Spada, J.C., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C., (2013). Water adsorption isotherms of microcapsules with hydrolyzed pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch as wall material. *Journal of Food Engineering*. 114, 64-69.
- Stintzing, F.C., Stintzing, A.S., Carle, R., Frei, B., Wrolstad, R.E., (2002). Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-Based Anthocyanin Pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 6172-6181.
- Takeda, Y., Shitaozono, T. y Hizuri, S. (1990). Structures of sub-fractions of corn amylose. *Carbohydrate research*. 199:207-214.
- Tantituvanont, A., Werawatganone, P., Jiamchaisri P., and K. Manopakdee. Thai J. (2008). Preparation and stability of butterfly pea color extract loaded in microparticles prepared by spray drying. *Pharmacy Science*. 32: 59-69.
- Thomas, D. J. y Atwell, W. A. (Eds). (1999). *Starches*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, U. S. A.
- Timberlake, C.F., 1980. Anthocyanins—Occurrence, extraction and chemistry. *Food Chemistry*. 5, 69-80.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* 43, 907-914.
- Tsuda T, F Horio, K Uchida, H Aoki, T Osawa (2003) Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Nutrient-Gene Interact*. 314:2125-2130.
- Varavinit, S., Chaokasem, N., Shobsngob, S., (2001). Studies of Flavor Encapsulation by Agents Produced from Modified Sago and Tapioca Starches. *Starch - Stärke* 53, 281-287.
- Wai-Bun, L. y Jinchyau P. (2003). The Effects of Die Shapes y Additives on the Physical y Biodegradable Properties of Biodegradable Cushioning Extruded Foams. *Packaging Technology y Science*. 2003: 1-8.
- Wang, Y., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., (2009). Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *European Food Research and Technology* 229, 391-396.
- Widodo, R.T., Hassan, A., (2015). Compression and mechanical properties of directly compressible pregelatinized sago starches. *Powder Technology*. 269, 15-21.
- Wing, R. E., y Willett, J. L. (1997). Water soluble oxidized starches by peroxide reactive extrusion. *Industrial Crops and Products*, 45-52.
- Yang, Z., Han, Y., Gu, Z., Fan, G., Chen, Z., (2008). Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays L.*) cob. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, 341-347.

- Yang, Z., Zhai, W., (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 470-476.
- Yilmaz, G., Jongboom, R. O., Feil, H., y Hennik, W. E. (2001). Encapsulation of sunflower oil in starch matrices via extrusion: effect of the interfacial properties y processing conditions on the formation of dispersed phase morphologies. *Carbohydrate Polymers*, 403-410.
- Zhang, L., Mou, D., Du, Y., (2007). Procyanidins: extraction and micro-encapsulation. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 87, 2192-2197.
- Zilic S, A Serpen, G Akillioglu, V Gökmen, J Vancetovic (2012) Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:1224-1231.

II.6 HIPÓTESIS

La modificación de los almidones mediante succinilación, acetilación y fosfatación, mejorará su capacidad para encapsular antocianinas de maíz en comparación con los almidones modificados por hidrólisis ácida.

II.7 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es evaluar la estabilidad de las antocianinas de maíz en microesferas producidas con almidones de maíz: succinatados, acetilados y fosfatados; producidas mediante metodologías convencionales y por medio de extrusión termoplástica.

Los objetivos específicos son:

1. Extraer las antocianinas del maíz negro de raza Cónico, cuantificar su contenido de antocianinas y polifenoles totales, así como la identificación de las antocianinas presentes mediante HPLC.
2. Obtener agentes encapsulantes mediante la modificación de almidones de maíz normal y ceroso. Dichas modificaciones son succinilación, acetilación y fosfatación.
3. Realizar la caracterización fisicoquímica de los almidones modificados.
4. Evaluar los efectos de las temperaturas de secado y de la concentración de material de pared, en microesferas producidas con el extracto de maíz negro, utilizando almidón fosfatado.
5. Encapsular antocianinas de maíz con los agentes encapsulantes producidos. Evaluar su morfología, determinar la retención de antocianinas después del secado por aspersión, la eficiencia de encapsulación y sus propiedades fisicoquímicas.
6. Determinar los datos de isotermas de adsorción para las microesferas de antocianinas de maíz a una temperatura de 40 °C, y determinar su estabilidad a diferentes humedades relativas. Analizar el efecto de la esterificación con anhídrido acético y con n-OSA en el comportamiento de adsorción de agua. Fue evaluado también el mejor material de pared a 30 y 4 °C.

III. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS

III.1 Introducción

Existe un gran interés en el uso de las antocianinas de maíz debido a que gran número de publicaciones han reportado sus efectos antioxidantes (García-Alonso *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2012, Tedesco *et al.*, 2001), sus efectos vasoprotectores (Xu *et al.*, 2004), anti-inflamatorios y anticancerígenos (Sweedman *et al.*, 2013). Las antocianinas previenen enfermedades como el Alzheimer (Vepsäläinen *et al.*, 2013), obesidad y diabetes (Rojo *et al.*, 2012, Shih *et al.*, 2010, Xu *et al.*, 2003).

Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, son las principales responsables de la amplia gama de colores que van del rosa salmón hasta el rojo y violeta en las variedades pigmentadas de maíz. El maíz negro contiene grandes cantidades de antocianinas en pericarpio y capa de aleurona, con un contenido de antocianinas de entre 2565 y 3045 mg / kg (Zhao *et al.*, 2009). La principal antocianina presente en maíz negro es la cianidina-3-glucósido y los derivados 3,5 diglucósidos de cianidina, peonidia y pelargonidina acilados con ácido málico (de Pascual-Teresa *et al.*, 2002). La estabilidad de las antocianinas depende de factores como: su estructura molecular, pH, temperatura, intensidad de la luz, la presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, oxígeno, ácido ascórbico, azúcares y sus productos de degradación y el dióxido de azufre, entre otros. El maíz negro mexicano presenta un alto contenido de antocianinas (Yang y Zhai, 2010, Salinas Moreno *et al.*, 2005, Lopez-Martinez *et al.*, 2009).

El objetivo de este capítulo es la extracción de las antocianinas de maíz negro de raza Cónico, cuantificar su contenido de antocianinas y polifenoles totales, así como la identificación de las antocianinas presentes mediante HPLC.

III.2 Materiales y métodos

III.2.1 Materiales

El maíz negro (*Zea mays* L.) de raza cónico fue colectado en San Juan Ixtenco, Tlaxcala, México. Ésta raza de maíz fue seleccionada debido a la intensa coloración negro que se atribuye a la concentración de antocianinas presentes tanto en el pericarpio como en la capa de aleurona.

Estándares de antocianinas: delphinidina-3-glucosido (Df-3-glu), cianidina-3-glucosido (Cd-3-glu), cianidina-3-rutinosido (Cd-3-ru), pelargonidina-3-glucosido (Pg-3-glu), peonidin-3-glucoside (Pn-3-glu) y malvidina-3-glucosido (Mv-3-glu) fueron adquiridas de Extrasynthese (Lyon Nord, Genay Cedex, France).

III.2.2 Color del grano

El color del grano se midió utilizando un colorímetro Hunter Lab (MiniScan Hunter Lab, modelo 45 / 0L, Hunter Associates Lab., Ind., EE.UU.), las mediciones de color se expresan en términos de luminosidad L^* ($L^* = 0$ para el negro y $L^* = 100$ para el blanco) y el parámetro a^* [verde (-) a rojo (+)]. Las mediciones se realizaron por triplicado y se realizaron tres lecturas para cada réplica.

III.2.3 Extracción de antocianinas de maíz

Los granos de maíz se equilibraron a 16 % de humedad. El pericarpio y capa de aleurona (FPCA) se eliminaron mecánicamente en una perladora Strong Scott Cebada Pearler operado de forma discontinua. 20 g de granos se perlaron durante 1 min. Los granos descascarillados fueron separados mediante un tamiz para eliminar los granos rotos y reintroducidos en la máquina durante 2 min. Este procedimiento se repitió 3 veces para producir niveles de extracción acumulativos de aproximadamente 16 % db. La FPCA separada se molió en un molino de martillos (modelo 200, Pulvex México) y se tamizó en una malla de 0.15 mm tamaño de la abertura. La extracción se realizó mezclando 12.5 g de FPCA y 150 ml de una mezcla de metanol, ácido acético y agua (10: 1: 9) en un matraz Erlenmeyer. La mezcla se sometió en un baño ultrasónico durante 15 min y se agitó durante 1:45 h. A continuación, el sobrenadante se separó por filtración usando papel de filtro

Whatman # 4 en un embudo Buchner con vacío (el residuo insoluble se volvió a extraer una vez bajo las mismas condiciones). El disolvente del sobrenadante se evaporó mediante un evaporador rotatorio a 35 °C y el extracto de maíz negro (PME) se almacenó en refrigeración hasta su uso.

III.2.4 Contenido de antocianinas totales

El contenido total de antocianinas (TAC) se determinó por el método pH-diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001) utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda 2S UV VIS) a 510 nm, y 700 nm. TAC se calculó sobre la base de cianidina-3-glucósido, usando el coeficiente de extinción de 26.900 cm⁻¹ mg L⁻¹, y un peso molecular de 449.2 g / l. Se utilizaron celdas de 1 cm de espesor.

III.2.5 Contenido de polifenoles totales

Los compuestos fenólicos totales se midieron usando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2001). La absorbancia de las muestras y estándares se midió a 765 nm. Los fenoles totales fueron calculados como equivalentes de ácido gálico en base a una curva patrón de ácido gálico. Las muestras y una curva preparada con concentraciones conocidas de ácido gálico (0 ~ 500 mg / L) se colocaron en 2 ml de viales con tapones. Se añadió agua desionizada hasta 1.6 ml en viales de estos, seguido por 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se mezclaron bien por inversión y se incubaron aproximadamente 1 a 8 min. Después se añadieron 300 µL de solución de carbonato de sodio al 20 % y se mezclaron vigorosamente. El volumen final fue de 3 mL, las muestras se incubaron en 40.0 ± 0.1 °C durante 20 min y se enfrió a temperatura ambiente inmediatamente en hielo. La absorbancia se midió a 765 nm.

III.2.6 Identificación del perfil de antocianinas mediante HPLC

La muestra de PME se filtró con papel de filtro Whatman N ° 4. A continuación, una alícuota (5 ml) se vertió en una columna de resina Amberlite XAD-7 (Whatman, Maidstone, Reino Unido), que se lavó con ácido acético al 5 % y se eluyó con metanol acidificado con ácido acético al 5 %. El extracto purificado se

filtró a través de un filtro de nylon de 0.45 micras antes de la inyección en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).

El extracto se analizó usando un sistema de HPLC 200 de Perkin-Elmer Series, equipado con un detector de matriz de fotodiodos una bomba cuaternaria y automuestreador con un compartimiento de columna termostaticado (PerkinElmer Instruments LLC, Shelton, CT, EE.UU.). La columna utilizada fue una C18 hypersil SAO columna de 5 μ (200 x 4,6 mm, Thermo Scientific, CA, EE.UU.).

Las áreas de los picos se integraron utilizando el software del sistema de datos de cromatografía, TotalChrome (PerkinElmer Instruments LLC, Shelton, CT, EE.UU.). Los disolventes utilizados fueron A (1: 9 v / v) (ácido fórmico / agua) y B (1: 4: 5 v / v) (ácido / agua / metanol fórmico). La separación se realizó usando un gradiente lineal de 10 a 100 % de A en 17 min. El caudal fue de 1.2 ml / min, volumen de inyección de 20 μ L (Fossen *et al.* 2001). Las antocianinas fueron identificadas de acuerdo con el tiempo de retención de HPLC de PME con las de los estándares antocianinas.

Se saponificó el extracto de antocianinas (1 ml) en un tubo de ensayo con tapón de rosca con 10 ml de KOH acuoso al 10 % durante 8 min a temperatura ambiente en la oscuridad (Durst y Wrolstad., 2001; Giusti *et al.*, 1999). La solución se neutralizó y se acidificó por HCl (2 mol / L), y el hidrolizado se purificó para analizarse mediante HPLC. Las antocianidinas (agliconas) se determinaron por el método de Giusti y Wrolstad, (2001). Una alícuota de PME (1 ml) se mezcló con 10 ml de HCl (2 mol / l) en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 20 ml. Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 30 min y después se enfriaron en un baño de hielo. La muestra se concentró y se analizó en HPLC (Durst y Wrolstad, 2001; Giusti *et al.*, 1999).

III.3 Resultados y discusión

III.3.1 Contenido de antocianinas y polifenoles totales

Los granos fueron remojados a 16, 18 y 20 % de humedad y se seleccionaron los remojados al 18 % ya que a dicha humedad se favoreció el desprendimiento del pericarpio y capa de aleurona de los granos, a humedad del 20 % no se recomienda porque se solubilizan las antocianinas. Se obtuvo un rendimiento del 16.13 % FPCA (fracción pericarpio y capa de aleurona) con relación al peso del grano en base seca.

El contenido de antocianinas monoméricas en la FPCA fue de 4,260 mg / kg (b.s.), y 947.23 mg / kg en grano entero expresado como g de cianidina-3-glucósido / kg de muestra (db). Se obtuvo un mayor contenido de antocianinas con relación a los valores reportados para el maíz morado chino, (558 mg) (Zhao *et al.*), el maíz morado Boliviano (715.2 mg / kg) (Cuevas Montilla *et al.* 2011), y de maíz negro ceroso (754 mg / kg) (Harakotr *et al.*, 2014). Las diferencias pueden ser atribuidas a la naturaleza de las muestras y prácticas de cultivo.

El contenido de polifenoles totales en el grano entero fue de 7090 mg de ácido gálico/kg (db) en la FPCA y de 2798.69 mg de ácido gálico / kg (db) y sobre la base de estos resultados, el 34 % del total de compuestos fenólicos fueron antocianinas en el grano entero y el 60 % en FPCA. Por lo tanto se considera como una alta concentración de antocianinas y porcentaje de compuestos fenólicos totales, ideal en el procesamiento y aplicación del extracto de antocianinas como colorante natural.

En relación con las propiedades de color de los granos, granos molidos y FPCA se puede observar en el **Cuadro III. 1**, en donde se observó un valor de luminosidad de 19.87 en el grano de maíz negro y está relacionado con el contenido de antocianinas (947.23 mg/kg), por ejemplo Salinas-Moreno *et al.*, (2012) reportaron un valor de $L^* = 18.8$, y correspondió a 1046.1 mg / kg de antocianinas totales. En el maíz negro obtuvimos un valor más claro que corresponde a un menor contenido de antocianinas.

Cuadro III. 1. Contenido de antocianinas y polifenoles, parámetros de color en maíz negro, maíz molido y FPCA de las muestras analizadas.

Sample	CAT*	CPT*	L	a	b	C
Grano entero	947.23	2798.69	19.87±0.81	3.93±0.18	0.81±0.18	4.01±0.17
Grano molido			65.76±0.46	2.34±0.06	0.72±0.04	2.46±0.04
FPCA	4260	7090.0	47.16±0.33	6.98±0.07	-0.35±0.04	7.00±0.08

CAT: contenido de antocianinas totales expresado en mg de cianidina-3-glucosido/kg de muestra en base seca. CPT: contenido de polifenoles totales expresados en mg de acid galico/kg de muestra en base seca. ¹Media aritmética de tres repeticiones ± error estándar.

III.3.2 Identificación del perfil de antocianinas

La técnica de HPLC se utilizó para identificar las antocianinas del maíz negro en la FPCA. El perfil cromatográfico mostró 15 picos como se observa en la **Figura III. 1** (B). El perfil de antocianinas fue similar al reportado para el maíz púrpura de China y Bolivia (Zhao *et al.*, 2011, Cuevas Montilla *et al.* 2011). Su identificación se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares conocidos. El primer pico corresponde al estándar de cianidina-3-glucósido, el segundo pico no fue identificado, el tercer pico corresponde al estándar de cianidina-3-rutinósido, el cuarto pico corresponde al estándar de pelargonidina-3-glucósido, el quinto pico corresponde a una antocianina acilada puesto que después de la hidrólisis alcalina desapareció, entonces se asignó al glucósido de cianidina-3-malonil glucósido (Zhao *et al.*, 2011) y el sexto pico fue asignado al estándar de peonidina-3-glucosida, el séptimo pico no fue identificado. Después del pico octavo, se observó que las antocianinas son de tipo acilado y deben derivarse de la antocianidinas: cianidina, peonidina y pelargonidina, ya que en la hidrólisis ácida de estos compuestos se mostraron tres compuestos en la siguiente proporción: 82, 46, 6,3 y 11.2 %, respectivamente (Zhao *et al.*, 2011, Cuevas Montilla *et al.*, 2011). El octavo pico fue asignado a cianidina-3-(6"-malonylglucosido), el noveno pico se asignó a peonidina-3-malonilglucósido, el décimo se desconoce, en el pico número 11 se observa que coeluyen dos picos, el 12 es peonidina 3 (6" malonilglucósido), el 13 es desconocido, el 14 pico es pelargonidina-3-(dimalonil glucósido) y finalmente el 15 se asignó a peonidina-3-(dimalonilglucosido).

La proporción de antocianinas aciladas en maíz negro Cónico fue 61.63 % del total de antocianinas monoméricas. La acilación de azúcares con ácidos alifáticos provoca la donación de electrones a los grupos cromóforos y conduce a un desplazamiento batocrómico y un efecto hipercrómico (Von Elbe y Schwartz, 1996; Giusti *et al.*, 1999) y también, contribuye a un efecto estabilizador importante en antocianinas través de la interacción intermolecular (Giusti y Wrolstad, 2003). En consecuencia, las antocianinas aciladas presentan mayor estabilidad, éstas pueden impartir un color más deseable y una mayor estabilidad en productos alimenticios (Giusti y Wrolstad, 2003). Por lo tanto no sólo el contenido total de antocianinas monoméricas y la proporción de antocianinas y fenoles totales, sino también, el porcentaje de antocianinas aciladas deben ser considerados para su uso potencial para colorantes alimenticios.

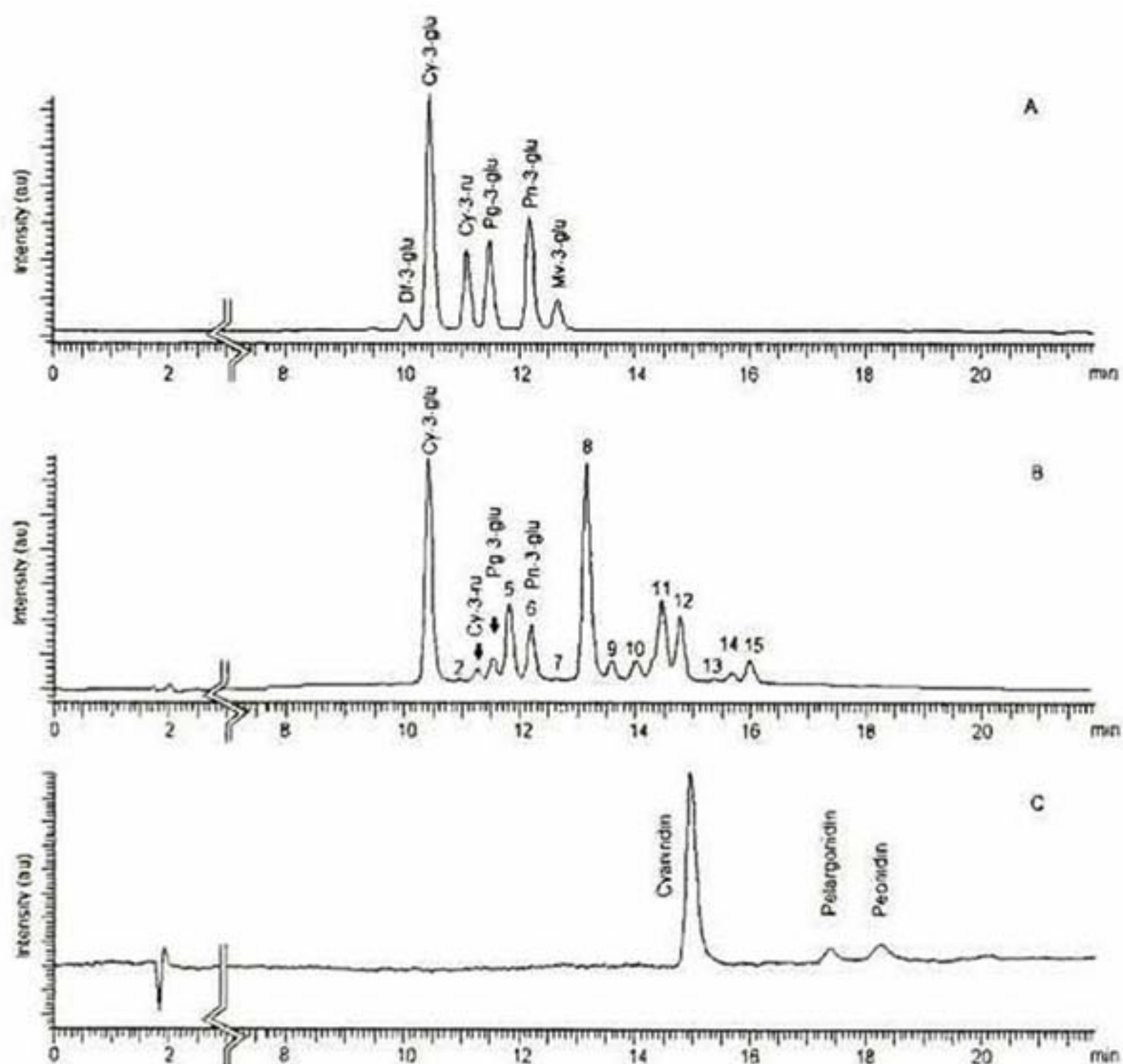


Figura III. 1. Idétficación de antocianinas mediante HPLC. cromatograma de los estándares de antocianinas (A), extracto de antocianinas de maíz (B) extracto hidrolizado con HCl (C).

Cuadro III. 2. Identificación de antocianinas en maíz negro.

Pico	Rt (min)¹	Identificación	%Area relativa
1	9.7	Cianidina-3-glucosido	26.86
2	10.2	?	
3	10.5	?	1.56
4	10.8	Pelargonidina-3-glucosido	3.44
5	11.1		7.49
6	11.5	Peonidina-3-glucosido	6.53
7	11.9	Cianidina-3-(6 di malonil glucosido)	
8	12.4		32.23
9	12.9	Pelargonidina-3-6 malonilglucoside	0.78
10	13.3	Peonidina 3-6 malonilglucosido	2.67
11	13.7		9.4
12	14.0	Peonidina-3-malonilglucosido	7.29
13	14.6		
14	15.0	Pelargonidina dimalonil glucosido	0.55
15	15.2	Peonidina 3 dimalonil glucosido	1.22
1'	15.0	Cianidina	82.46
2'	17.3	Pelargonidina	6.30
3'	18.3	Peonidina	11.23

¹Rt: Tiempo de retención.

III.4 Conclusiones

- El maíz negro es una fuente rica de antocianinas y es una alternativa de uso potencial para su incorporación en matrices alimenticias.
- La remoción de las capas periféricas del grano de maíz como el pericarpio y la aleurona, favorecieron la concentración del pigmento y el ahorro en el uso de disolventes para la extracción de las antocianinas.
- Mediante la técnica de HPLC se pudieron observar 15 tipos de antocianinas. Las antocianinas derivadas de la cianidina fueron las más predominantes, con un contenido de 82.5 %.

III.5 Referencias

- Anderson, R.A., Conway, H.F., Peplinski, A.J., (1970). Gelatinization of Corn Grits by Roll Cooking, Extrusion Cooking and Steaming. *Starch Stärke* 22, 130-135.
- Bello-Pérez, L.A., Agama-Acevedo, E., Zamudio-Flores, P.B., Mendez-Montealvo, G., Rodríguez-Ambríz, S.L., (2010). Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT - Food Science and Technology* 43, 1434-1440.
- Cai, Y.Z., Corke, H., (2000). Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science* 65, 1248-1252.
- Chatakanonda, P., Varavinit, S., Chinachoti, P., (2000). Effect of Crosslinking on Thermal and Microscopic Transitions of Rice Starch. *LWT Food Science and Technology* 33, 276-284.
- Cheetham, N.W.H., Tao, L., (1998). Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*. 36, 277-284.
- Cooke, D., Gidley, M.J., (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*. 227, 103-112.
- Cuevas Montilla, E.F., Hillebrand, S.F., Antezana, A.F., Winterhalter, P., (2011). Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*. 13,7068-74.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., Marín-Arroyo, M., (2013). Optimization of a wall material formulation to microencapsulate a grape seed extract using a mixture design of experiments. *Food and Bioprocess Technology* 6, 941-951.
- De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., (2002). Analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1003-1006.
- Ersus, S., Yurdagel, U., (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. 80, 805-812.
- García-Alonso, M., Minihane, A., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C., de Pascual-Teresa, S., (2009). Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 20, 521-529.
- Godet, M.C., Bizot, H., Buléon, A., (1995). Crystallization of amylose fatty acid complexes prepared with different amylose chain lengths. *Carbohydrate Polymers*. 27, 47-52.
- Gunaratne, A., Corke, H., (2007). Influence of prior acid treatment on acetylation of wheat, potato and maize starches. *Food Chemistry*. 105, 917-925.
- Jeon, Y., Lowell, A.V., Gross, R.A., 1999. Studies of Starch Esterification: Reactions with Alkenylsuccinates in Aqueous Slurry Systems. *Starch Stärke* 51, 90-93.
- Kshirsagar, A.C., Singhal, R.S., (2008). Preparation of hydroxypropyl corn and amaranth starch hydrolyzate and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Food Chemistry*. 108, 958-964.
- Li, J., Lim, S.S., Lee, J., Kim, J., Kang, S., Kim, J., Kang, Y., (2012). Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and

- inflammation: possible renoprotective role in diabetic nephropathy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 23, 320-331.
- Lopez-Martinez, L.X., Oliart-Ros, R.M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C., Parkin, K.L., Garcia, H.S., (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT Food Science and Technology* 42, 1187-1192.
- Luo, Z., Shi, Y., (2012). Preparation of Acetylated Waxy, Normal, and High-Amylose Maize Starches with Intermediate Degrees of Substitution in Aqueous Solution and Their Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 9468-9475.
- Manoi, K., Rizvi, S.S.H., (2010). Physicochemical characteristics of phosphorylated cross-linked starch produced by reactive supercritical fluid extrusion. *Carbohydrate Polymers*. 81, 687-694.
- Miladinov, V.D., Hanna, M.A., (2000). Starch esterification by reactive extrusion. *Industrial Crops and Products*. 11, 51-57.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C.I., Martínez-Bustos, F., (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 91, 380-386.
- O'Brien, S., Wang, Y., Vervaet, C., Remon, J.P., (2009). Starch phosphates prepared by reactive extrusion as a sustained release agent. *Carbohydrate Polymers*. 76, 557-566.
- Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., Morales, A.L., (2010). Microencapsulation by Spray-Drying of Anthocyanin Pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 6977-6985.
- Palma-Rodriguez, H.M., Agama-Acevedo, E., Gonzalez-Soto, R.A., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., Bello-Perez, L.A., (2013). Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from different botanical sources. *Starch - Stärke* 65, 584-592.
- Phillips, D.L., Liu, H., Pan, D., Corke, H., (1999). General Application of Raman Spectroscopy for the Determination of Level of Acetylation in Modified Starches. *Cereal Chemistry*. 76, 439-443.
- Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J., Santos, J., (2012). Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*. 134, 1-8.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C., (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science Technology* 45, 1386-1394.
- Rojo, L.E., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M.H., Lila, M.A., Raskin, I., (2012). In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*. 131, 387-396.
- Salinas Moreno, Y., Sánchez, G.S., Hernández, D.R., Lobato, N.R., (2005). Characterization of Anthocyanin Extracts from Maize Kernels. *Journal of Chromatographic Science* 43, 483-487.
- Shih, P., Chan, Y., Liao, J., Wang, M., Yen, G., (2010). Antioxidant and cognitive

- promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 21, 598-605.
- Singh Sandhu, K., Singh, N., Lim, S., (2007). A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *LWT Food Science and Technology* 40, 1527-1536.
- Z, X., He, G., Ruan, H., Chen, Q., (2006). Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Early Indica Rice Starch. *Starch Stärke* 58, 109-117.
- Spada, J.C., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C.,(2012). Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*. 89, 1166-1173.
- Sweedman, M.C., Tizzotti, M.J., Schäfer, C., Gilbert, R.G., (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. *Carbohydrate Polymers*. 92, 905-920.
- Tedesco, I., Luigi Russo, G., Nazzaro, F., Russo, M., Palumbo, R., (2001). Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 12, 505-511.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* 43, 907-914.
- Van Soest, J.J.G., Hulleman, S.H.D., de Wit, D., Vliegenthart, J.F.G., (1996). Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products* 5, 11-22.
- Vepsäläinen, S., Koivisto, H., Pekkarinen, E., Mäkinen, P., Dobson, G., McDougall, G.J., Stewart, D., Haapasalo, A., Karjalainen, R.O., Tanila, H., Hiltunen, M., (2013). Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 24, 360-370.
- Wang, L., Wang, Y., (2001). Structures and Physicochemical Properties of Acid-Thinned Corn, Potato and Rice Starches. *Starch - Stärke* 53, 570-576.
- Wang, Y., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., (2009). Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *European Food Research and Technology* 229, 391-396.
- Xu, J., Ikeda, K., Yamori, Y., (2004). Cyanidin-3-glucoside regulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*. 574, 176-180.
- Xu, J.-., Ikeda, K., Yamori, Y., (2003). Cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment, induces expression of endothelial nitric oxide synthase through Src-ERK1/2 signaling pathway. *Atherosclerosis Supplements* 4, 281-282.
- Yang, Z., Zhai, W., (2010). Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 169-176.
- Zhao, X., Zhang, C., Guigas, C., Ma, Y., Corrales, M., Tauscher, B., Hu, X., (2009). Composition, antimicrobial activity, and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays* L.) from China. *European Food Research and Technology*.

IV. PREPARACIÓN DE AGENTES ENCAPSULANTES

IV.1 Introducción

En el proceso de secado por aspersión, el material encapsulante actúa como una barrera física contra los efectos del oxígeno, agua, luz, e inhibe la degradación química y enzimática (Wang *et al.*, 2009). La selección de un agente encapsulante adecuado es importante para la estabilidad de las antocianinas.

Los agentes encapsulantes utilizados en microencapsulación incluyen: gomas, polisacáridos, lípidos, proteínas, fibras y mezclas de ellos (Davidov-Pardo *et al.*, 2013). Para la microencapsulación de antocianinas se han utilizado almidones de diversas fuentes. Estos incluyen el maíz, la yuca y la papa, se han utilizado debido a que son abundantes en la naturaleza y son más baratos que la goma arábiga (Cai and Corke, 2000, Robert *et al.*, 2010, Tonon *et al.*, 2010).

Los almidones nativos aumentan su eficiencia de microencapsulación por medio de la modificación (también llamado derivatización). El almidón puede ser sometido a modificaciones químicas, físicas, mecánicas y enzimáticas, que pueden causar cambios en su estructura, para obtener así las características deseadas en el producto final. Dichos cambios son de utilidad tecnológica, por lo que el almidón es modificado de diferentes maneras. Para caracterizar el nivel de modificación, se utiliza el grado de sustitución, que es el número promedio de grupos que sustituyen a los grupos hidroxilos de cada unidad de D-glucopiranosil, en la cual se tienen 3 grupos disponibles (Miladinov y Hanna, 2000a).

Entre los almidones modificados utilizados como agentes encapsulantes se incluyen las maltodextrinas que, resultan de la acción de ácidos o enzimas específicas en los almidones (Spada *et al.*, 2012); son consideradas como buenos protectores durante el proceso de secado por aspersión, ya que presentan una alta solubilidad y baja viscosidad a altas concentraciones de sólidos (Cai y Corke, 2000, Ersus y Yurdagel, 2007, Robert *et al.*, 2010, Tonon *et al.*, 2010). Por otra parte, los almidones modificados por hidrólisis ácida han mostrado buenas propiedades de encapsulación

(Palma-Rodriguez *et al.*, 2013, Spada *et al.*, 2012). Para aumentar la estabilidad de las antocianinas encapsuladas, es deseable tener una baja absorción de humedad.

Los almidones entrecruzados con tripolifosfato de sodio (Kshirsagar y Singhal, 2008), los almidones hidrolizados tales como: maltodextrinas, ciclodextrinas y dextrinas almidones hidrolizados y esterificados con anhídrido octenil succínico (*n*-OSA) (Verdalet-Guzmán *et al.*, 2013), se han utilizado como materiales encapsulantes debido a que forman una emulsión fina y estable (Bangs y Reineccius, 1988, Thirathumthavorn y Charoenrein, 2006). El almidón acetilado, ha sido utilizado para la encapsulación de ácido gálico (Robert *et al.*, 2012) y de igual manera le confiere al almidón propiedades emulsificantes.

El objetivo del presente trabajo e incluido en este capítulo es producir almidones modificados para posteriormente utilizarlos como agentes encapsulantes y caracterizarlos fisicoquímicamente. Para ello, los almidones de maíz normal y ceroso fueron sometidos a hidrólisis ácida, esterificación con anhídrido acético ó anhídrido *n*-octenil succínico, y a una subsecuente hidrólisis mediante extrusión. Ambos almidones fueron también fosfatados por extrusión con tripolifosfato de sodio sin realizar una hidrólisis ácida previa.

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Hidrólisis ácida

Los almidones fueron hidrolizados con ácido clorhídrico (HCl) de acuerdo con el método de Múrua-Pagola *et al.*, (2009) en una dispersión de almidón al 40 % en agua con HCl, la cual, contenía 3.4 g de HCl por cada 100 g de almidón en base seca (b. s). La hidrólisis se llevó a cabo en un baño a 50 °C con agitación constante durante 6 h, terminado el tiempo de reacción, se ajustó el pH a 5.0 ± 5.20 mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5 % (p/V). Posteriormente la mezcla de reacción se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min en una centrifuga Hermle Z200 y se realizaron tres lavados con agua destilada. El almidón se secó en

una estufa por convección forzada a 45 °C durante 24 h y una vez seco se molió y tamizó.

IV.2.2 Succinilación

El método convencional se realizó de acuerdo al método descrito por Jeon *et al.*, (1999), en suspensión acuosa. A una dispersión al 35 % de sólidos de almidón, previamente hidrolizado, se le adicionó por goteo y en agitación, anhídrido n-octenil succínico en una proporción de 2 mL/50 g de almidón en base seca, manteniendo un pH constante de 8.5-9 durante un tiempo total de 6 horas. Posteriormente se ajustó el pH a 4.5 y la suspensión se centrifugó para eliminar residuos del reactivo. Se llevaron a cabo dos lavados con agua destilada. El almidón succinatado fue secado a 45 °C durante 24 horas, pulverizado y cribado en una malla de 250 µm. El almidón modificado fue extrudido en las condiciones descritas para almidón fosfatado.

IV.2.3 Acetilación de almidón

La modificación convencional se llevo a cabo de acuerdo al método descrito por Phillips *et al.*, (1999) en suspensión acuosa. Se dispersaron 100 gr de almidón hidrolizado en 230 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 8.0 con solución acuosa de NaOH al 3 % y se adicionó por goteo 2.5 gr de anhídrido acético/100 gramos de almidón en agitación constante. La suspensión de almidón se mantuvo en agitación por 10 minutos adicionales después de la adición del reactivo y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos para separar el sobrenadante. Se llevó a cabo un lavado con agua destilada. Una vez realizada la modificación química, las muestras fueron acondicionadas a 18 % de humedad y extrudidas en las mismas condiciones de extrusión descritas para la fosfatación de almidón.

IV.2.4 Fosfatación

Se realizó en un extrusor de tornillo simple fabricado en el CINVESTAV-IPN (**Figura IV. 1**), el diámetro interno del barril es de 20 mm con una relación largo diámetro de 20 (L/D=20). Se operó con temperaturas de 70, 150 y 180 °C, en las zonas de alimentación, transición y salida, respectivamente. La velocidad de tornillo fue de 80 rpm y la de alimentación de 70 g/min. Se pesaron 4 g de

tripolifosfato de sodio (TPS) por cada 100 g de almidón, el TPS se disolvió con una solución de ácido clorhídrico y se ajustó el pH a 5.0, ésta solución se agregó al almidón y se ajustó a una humedad del 18 %. Posteriormente se dejó humectar por 24 h para proceder con la extrusión. Los extrudidos fueron secados a 45 °C y se molieron en un molino marca Pulvex modelo 200 con una malla de abertura igual al 49 μm .



Figura IV. 1. Extrusión reactiva.

IV.2.5 Grado de sustitución en almidón fosfatado

El contenido de fósforo de los almidones fosfatados se determinó siguiendo el método descrito por Smith y Caruso (1964). Que consistió en remover los fosfatos mediante su lavado con una mezcla de etanol y agua (50:50, p/p). Posteriormente se pesaron 10 g de almidón y se adicionaron 10 mL de solución de acetato de zinc (10 % p/p). Se evaporó la solución por secado en la estufa y baño María, seguido por calcinación en la mufla a 550 °C por 2 horas. Después de enfriado, se humectó el plato con 3 mL de ácido nítrico (29 % p/p) y se evaporó en un baño de vapor y se colocó en la mufla a 550 °C por 30 min. Se enfrió nuevamente y el plato se lavó con 10 mL de solución de ácido nítrico (29 % p/p), 10 mL de vanadato de amonio (0.25 % p/p) y 10 mL de molibdato de amonio (5 % p/p). Se mezclaron los reactivos y se dejaron reposar por 10 min para poder medir la absorbancia a 460 nm con un

espectrofotómetro UV-Visible marca Cintra, modelo 20 (GBS Scientific Equipment Pty Ltd., Australia). Se midió el contenido de fósforo mediante análisis de regresión de los valores de absorbancia del almidón fosfatado con la curva de calibración preparada a partir de muestras a partir de cantidades conocidas de fósforo. Una vez determinado el contenido de fósforo, se calculó el grado de sustitución de fósforo, de acuerdo con la siguiente ecuación reportada por Chang y Lii (1992). Donde P es el porcentaje de fósforo en base seca del almidón. El grado de sustitución fue calculado con la siguiente ecuación:

$$DS = 162P/(3100-102P).$$

Donde P = % de fósforo (en base seca) en el almidón fosfatado.

IV.2.6 Grado de sustitución en almidón acetilado y succinilado

Se determinó de acuerdo a lo reportado por Jeon *et al.*, (1999). Se disolvió 0.1 gr de muestra en 10 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se calentó durante 10 minutos a 70 °C. Después de enfriar, se adicionaron 5-6 gotas de indicador de fenoftaleína. La solución fue titulada con una solución estándar de 0.05 M de hidróxido de sodio hasta obtener un color rosa pálido. El grado de sustitución fue obtenido mediante la ecuación de Song *et al.*, (2006) utilizando el peso molecular del ácido acético.

$$GS = \frac{0.162 \times (V \times M) / W}{1 - (0.102 \times (V \times M)) / W}$$

M: Molaridad de la solución NaOH

V: Volumen titulado de NaOH

162: Peso molecular de la unidad de glucosa

W: Peso del almidón

IV.2.7 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB)

El fundamento de esta técnica se basa en la utilización de electrones para formar una imagen del objeto en el que inciden. Los microscopios para este tipo de análisis están equipados con un filamento para producir electrones, enfocados por

una serie de electroimanes, que al momento en que chocan los electrones con la superficie de la muestra se devuelve una señal hacia un detector que proyecta la imagen en una pantalla. La microscopía electrónica de barrido provee una mayor perspectiva de la superficie del gránulo de almidón así como de su morfología. La morfología externa de las antocianinas encapsuladas se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (ESEM EDAX, detector de GSE, Holanda), usando un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras encapsuladas se fijaron en una cinta metálica adhesiva de doble cara. Las microesferas fueron analizadas con el software Image-Pro Plus versión 4.5.1.22 (Media Cybernetics, Ing.).

IV.2.8 Calorimetría de Barrido Diferencial (CDB)

El principio fundamental de la CBD es la detección de los cambios de flujo de calor asociados con transiciones de primer orden (fusión) y de segundo orden (transición vítrea) de los polímeros. Para el análisis, la muestra de almidón y una referencia se sometieron a un programa de calentamiento, registrándose una endoterma (pico) que relaciona el flujo calórico como una función de la temperatura; cuando se lleva a cabo la gelatinización del almidón, hay una transición de fase, por lo que en ese momento el equipo suministra más calor a la referencia para compensar el calor y se produce una endoterma (Sandoval *et al.*, 2005).

Se utilizó un calorímetro de barrido diferencial (DSC 822e Mettler Toledo Lab Plant Birefrigerated, Huddersfield, England). El equipo fue calibrado con Indio, el cual tiene un punto de fusión de 156.4 °C y una entalpía de $h = 6.8 \text{ cal / g}$. Para determinar la temperatura de gelatinización se empleó el método propuesto por Paredes-López *et al.* (1994). El método consistió en pesar 2 mg de muestra (en base seca) en un crisol utilizando una balanza con una precisión de $\pm 0.01 \text{ mg}$, posteriormente se agregaron 7 μL de agua desionizada, se selló herméticamente y se dejó humectar durante 30 min. En el DSC se colocó un crisol vacío como referencia y se utilizó el programa de calentamiento.

IV.2.9 Características de viscosidad

El ARV (Análisis rápido de viscosidad) es un instrumento desarrollado para determinar las propiedades de viscosidad (formación de pastas) del almidón cocido. Este aparato mide continuamente la viscosidad bajo condiciones variables de cizallamiento y temperatura. El perfil de formación de pastas involucra a los componentes estructurales y moleculares del almidón y es influenciado por la velocidad de calentamiento y la concentración de almidón. El análisis de este parámetro es útil para identificar el comportamiento de un almidón bajo procesos del calentamiento-enfriamiento (Higley *et al.*, 2003). Los análisis se realizaron en un 3C Rapid Visco Analyzer (RVA, Newport Scientific PTY LTD, Sydney Australia). Las muestras fueron preparadas mezclando almidón (2.5 g) y 25.5 mL de agua destilada. La mezcla fue agitada manualmente para facilitar la medición. Se programó el equipo con un ciclo de calentamiento-cocción-enfriamiento, cada muestra fue equilibrada a 50 °C durante 1 min, calentada a 92 °C con una velocidad de calentamiento de 5.6 °C/min, se mantuvo constante a 92 °C por 5 min, y se enfrió a 50 °C a una velocidad de 5.6 °C/min y se mantuvo a una temperatura de 50 °C durante 2 min. El tiempo total del análisis fue de 23 min.

IV.2.10 Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)

Ambos índices fueron determinados a los almidones extrudidos siguiendo el método descrito por Anderson *et al.*, (1970) con algunas modificaciones. Se realizaron tres repeticiones para cada análisis y los valores se reportaron como un promedio. Se pesaron 2.5 g de muestra en un tubo de centrifuga de 50 mL y se adicionaron 3 mL de agua destilada. Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 30 °C y en agitación constante por 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos. Se registró el peso del residuo sólido y el sobrenadante fue evaporado en un crisol de aluminio en una estufa a temperatura de 105 °C. El peso del residuo en el crisol fue registrado como residuo de evaporación.

IV.2.11 Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X se basa en la radiación electromagnética con una longitud de onda de 0.1–1 nm, que es comparable al espacio molecular en un cristal. Cuando el destello de los rayos X choca con un cristal colocado en una superficie especial, permite que el cristal sea rotado con respecto al destello incidente y la difracción ocurre. La difracción es el fenómeno que se presenta cuando una onda en movimiento interactúa con un obstáculo (Zobel, 1988). El patrón de difracción de rayos X, se utiliza para detectar cambios en la cristalinidad de la amilopectina, causados por tratamientos físicos o químicos en los gránulos de almidón.

El patrón de difracción de rayos X de los almidones nativos y modificados fue determinado en el equipo de difracción marca Rigaku Dmax2100, equipado con una fuente de radiación de CuK la cual opera a 30 kV a una longitud de onda de $\lambda = 1.5444 \text{ \AA}$. Los datos se colectaron a un ángulo de intervalo de 2θ de 4° a 60° en una escala de cada 0.030° . El software utilizado para el análisis del espectro fue OriginPro 8 (OriginLab Corporation, MA, USA).

IV.3 Resultados y discusión

IV.3.1 Grado de sustitución de los almidones modificados (GS), índice de absorción de agua (IAA) e índice de solubilidad de agua (ISA).

El grado de sustitución (GS) de los almidones modificados se presenta en el **Cuadro IV.1**. En donde se presentaron valores similares a los reportados por Murúa-Pagola *et al.*, (2009), para almidón ceroso succinatado (0.042), almidón ceroso acetilado (0.033) y almidón ceroso fosfatado (0.046). Los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos permitidos por la FDA.

Se ha reportado que la fuente de almidón afecta el grado de modificación, los grados de sustitución obtenidos en las tres modificaciones para los dos tipos de almidones, fueron mayores en los almidones cerosos. Este comportamiento se atribuye a que el almidón ceroso en comparación con el almidón normal presenta un

mayor hinchamiento durante la esterificación. Por lo tanto, los almidones cerosos esterificados presentaron un mayor grado de sustitución (Phillips *et al.*, 1999, Luo y Shi, 2012). Luo y Shi (2012), reportaron un valor de 0.3 para almidón de maíz normal y 0.27 para almidón de maíz ceroso acetilados.

El Cuadro IV.1., muestra el IAA e ISA de los almidones nativos y los almidones modificados. La solubilidad en agua en todos los almidones modificados fue mayor que en su contraparte, los almidones nativos. El incremento en la solubilidad de los almidones se atribuye a la hidrólisis tanto de la amilosa como de la amilopectina. La solubilidad de los almidones esterificados fue mayor en los succinatados, con relación a los almidones acetilados. Esto puede ser atribuido a la mayor densidad del *n*-OSA en comparación con el anhídrido acético. De acuerdo a Miladinov y Hanna (2000b), la esterificación por extrusión mediante el uso de ácidos grasos de cadena larga como el ácido heptanoico y el ácido palmítico, promueven una mayor humectancia en comparación a los ácidos grasos de cadena corta como el acético y propiónico. El fenómeno se da con la interrupción de la estructura cristalina del almidón, en donde se incrementan los puentes de hidrógeno entre el almidón y el agua. Estos autores reportaron un valor similar al obtenido en éste trabajo para almidón acetilado por extrusión (WAI de 3.2).

Comparando las tres modificaciones en cada tipo de almidón, se observa que los parámetros de IAA e ISA fueron menores en el almidón fosfatado por extrusión. Manoi y Rizvi, (2010) reportaron que el entrecruzamiento mediante fosfatación, refuerza la estructura del almidón limitando la absorción de agua y su solubilidad, de este modo se restringe la movilidad de las cadenas de almidón en las regiones amorfas del gránulo. Rutledge *et al.* (1972, 1974) reportaron también una disminución en la absorción de agua después del entrecruzamiento con STMP. Los efectos de las tres modificaciones en WAI y WSI fueron más pronunciados en el almidón de maíz ceroso. Este resultado está asociado a la reducción de la longitud de cadena del almidón, que corresponde al debilitamiento de los enlaces de hidrógeno, y al aumento de grupos hidroxilo (Singh Sandhu *et al.*, 2007a). Se observa que el incremento en el grado de sustitución, es proporcional al incremento del ISA. MF presentó el más bajo grado de sustitución (0.011) y presentó la más baja solubilidad

(29 %), en cambio WS presentó el más alto grado de sustitución (0.096) y presentó la más alta solubilidad (74.13 %).

Cuadro IV. 1. Grado de sustitución, índice de absorción de agua e índice de solubilidad de agua de los almidones nativos, hidrolizados con HCl, esterificados con n-OSA y anhídrido acético, y entrecruzados con tripolifosfato de sodio.

Muestra ¹	GS	IAA	ISA (%)
N		1.28 ± 0.3	0.24 ± 0.03
NH		1.06 ± 0.02	1.00 ± 0.01
C		2.05 ± 0.09	0.27 ± 0.04
CH		2.02 ± 0.05	3.40 ± 0.02
NA	0.021 ± 0.01	3.59 ± 0.3	40.23 ± 0.35
NS	0.064 ± 0.00	5.31 ± 0.09	57.1 ± 1.05
NF	0.011 ± 0.00	4.06 ± 0.12	29.00 ± 1.8
CA	0.026 ± 0.01	0.77 ± 0.18	63.4 ± 1.23
CS	0.096 ± 0.00	1.56 ± 0.4	74.13 ± 0.21
CF	0.042 ± 0.00	1.03 ± 0.1	56.04 ± 6.23

NH: almidón normal de maíz hidrolizado; C: almidón ceroso de maíz; CH: almidón ceroso hidrolizado; NA: almidón normal acetilado; NS; almidón normal succinatado; NF: almidón normal fosfatado; CA: almidón ceroso acetilado; CS: almidón ceroso succinatado; CF: almidón ceroso fosfatado. ¹Media aritmética de tres repeticiones ± error estándar.

IV.3.2 Propiedades de gelatinización

Las propiedades de gelatinización de los almidones nativos y modificados, de maíz normal y de maíz ceroso, representadas por los valores de T_i (temperatura de inicio), T_p (temperatura de pico), T_f (temperatura final) y ΔH (entalpía de gelatinización) se presentan en el **Cuadro IV. 2.**

En comparación con el almidón normal de maíz, el almidón de maíz ceroso presentó valores mayores para todos los parámetros térmicos, ello se debe a la mayor cristalinidad del almidón ceroso y por consiguiente una mayor T_i . Se observa un aumento en T_p y una disminución en la ΔH de gelatinización de los almidones hidrolizados, siendo más acentuado en el almidón de maíz normal hidrolizado con relación al almidón de maíz ceroso hidrolizado (Wang y Wang, 2001). Las diferencias se atribuyen al diferente arreglo estructural que se presenta en cada tipo de almidón. Las regiones amorfas del gránulo de almidón se hidrolizan más fácilmente por ser más accesibles que las regiones cristalinas, las cuales, son más ordenadas. Una vez que el ácido penetra en el gránulo tanto la amilosa como la amilopectina se hidrolizan simultáneamente. Una vez degradada la región amorfa, queda como remanente la región cristalina, la cual, es gelatinizada posteriormente a una mayor temperatura (Gunaratne y Corke, 2007). Singl *et al.*, (2007b) reportaron una mayor temperatura de gelatinización después del tratamiento ácido en almidones de maíz (normal y ceroso), en comparación con los almidones nativos. La ΔH usualmente se relaciona con la cantidad de dobles hélices en la lamela cristalina. La hidrólisis ácida debilitó la estructura de los gránulos de almidón, y como consecuencia, permitió la ruptura de las dobles hélices de la amilopectina, por lo tanto se requirió menos energía para gelatinizar al almidón (Adebowale y Lawal, 2003).

Se observa una disminución en la temperatura y entalpía de gelatinización de los almidones acetilados. Los resultados son consistentes con trabajos previos referentes a la acetilación de almidones de diversas fuentes (Bello-Pérez *et al.*, 2010). La sustitución de grupos OH- por grupos acetilo inhibe la asociación de cadenas de almidón, promoviendo la hidratación del gránulo y requiriendo menos energía para alcanzar la gelatinización. Los almidones de maíz y de papa acetilados con un bajo grado de sustitución, presentaron una ligera disminución de la temperatura (aproximadamente 2 °C) y la entalpía de gelatinización en comparación con los almidones hidrolizados.

Después de la fosfatación por extrusión se observó un incremento en la temperatura de gelatinización; en el almidón fosfatado de maíz se incrementó 4.2 °C y en el almidón ceroso fosfatado 3.8 °C. Los resultados se encuentran acordes a lo reportado

en la literatura. Chatakanonda *et al.*, (2000) reportaron un incremento de 5 °C en la temperatura de gelatinización de almidón de arroz fosfatado utilizando mezclas de STMP/STTP, y Manoi y Rizvi, (2010) reportaron un incremento de 4 °C utilizando un 9 % de STMP y 0.1M de NaOH. Los autores concluyen que el entrecruzamiento con la introducción de grupos fosfato, refuerzan la estructura molecular, lo que lleva a un aumento en la temperatura de gelatinización. La entalpía disminuyó significativamente en ambos almidones fosfatados (Cuadro IV.2). La entalpía proporciona una medida general de cristalinidad e indica la pérdida del orden molecular dentro de los gránulos (Cooke y Gidley, 1992). La disminución en la entalpía sugiere un desorganizado arreglo o una más baja solubilidad en los cristales. Manoi y Rizbi, (2010) reportaron en almidones fosfatados por extrusión valores de entre 1.12-2.24 J/g.

Cuadro IV. 2. Propiedades de gelatinización de los almidones: nativos, hidrolizados, esterificados y fosfatados.

Modificación	almidón normal de maíz				almidón ceroso de maíz			
	T ₀ (°C)	T _P (°C)	T _C (°C)	ΔH _{gel}	T ₀ (°C)	T _P (°C)	T _C (°C)	ΔH _{gel}
Nativos	64.25	69.02	74.39	10.73	64.36	70.99	77.63	13.74
Hidrólisis	70.27	74.12	78.32	3.36	64.05	71.81	87.02	13.01
Acetilación	63.79	70.99	77.43	0.74	64.71	70.98	77.87	1.47
Succinilación	70.47	77.14	84.93	0.44	63.2	69	75.82	0.74
Fosfatación	72.80	78.32	83.05	0.36	69.2	75.61	84.41	1.48

T₀= Temperatura de inicio de la gealtinización, T_p= temperatura de pico de la gelatinización, T_c= Temperatura final de la gelatinización, ΔH_{gel}= entalpía de gelatinización (J/g). ¹Media aritmética de dos repeticiones

IV.3.3 Difracción de rayos X

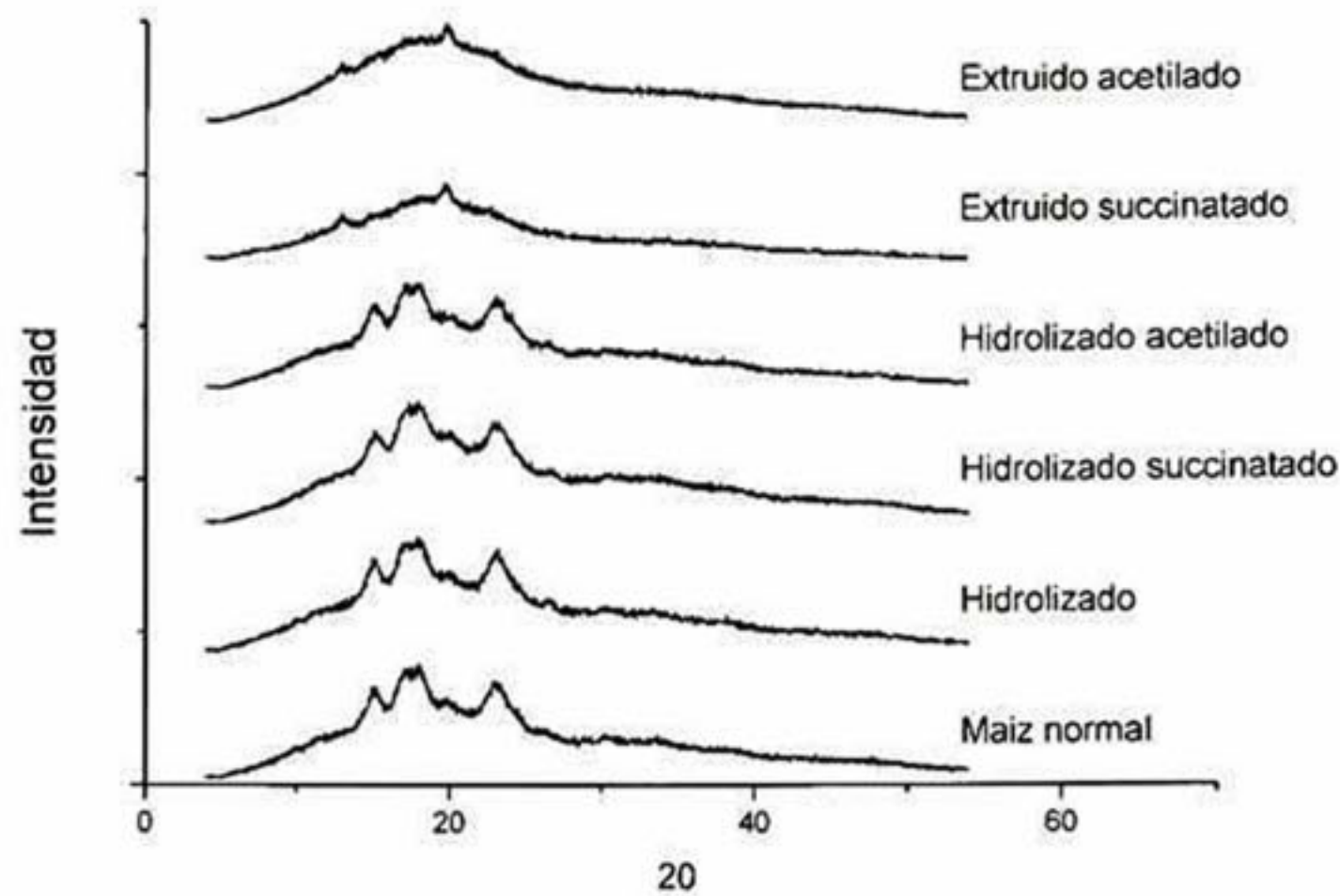


Figura IV. 2. Patrón de difracción de rayos X del almidón de maíz normal, almidón de maíz normal hidrolizado, almidón de maíz hidrolizado y succinatado, almidón de maíz hidrolizado y acetilado, almidón hidrolizado, succinatado y extrudido, almidón hidrolizado, acetilado y extrudido.

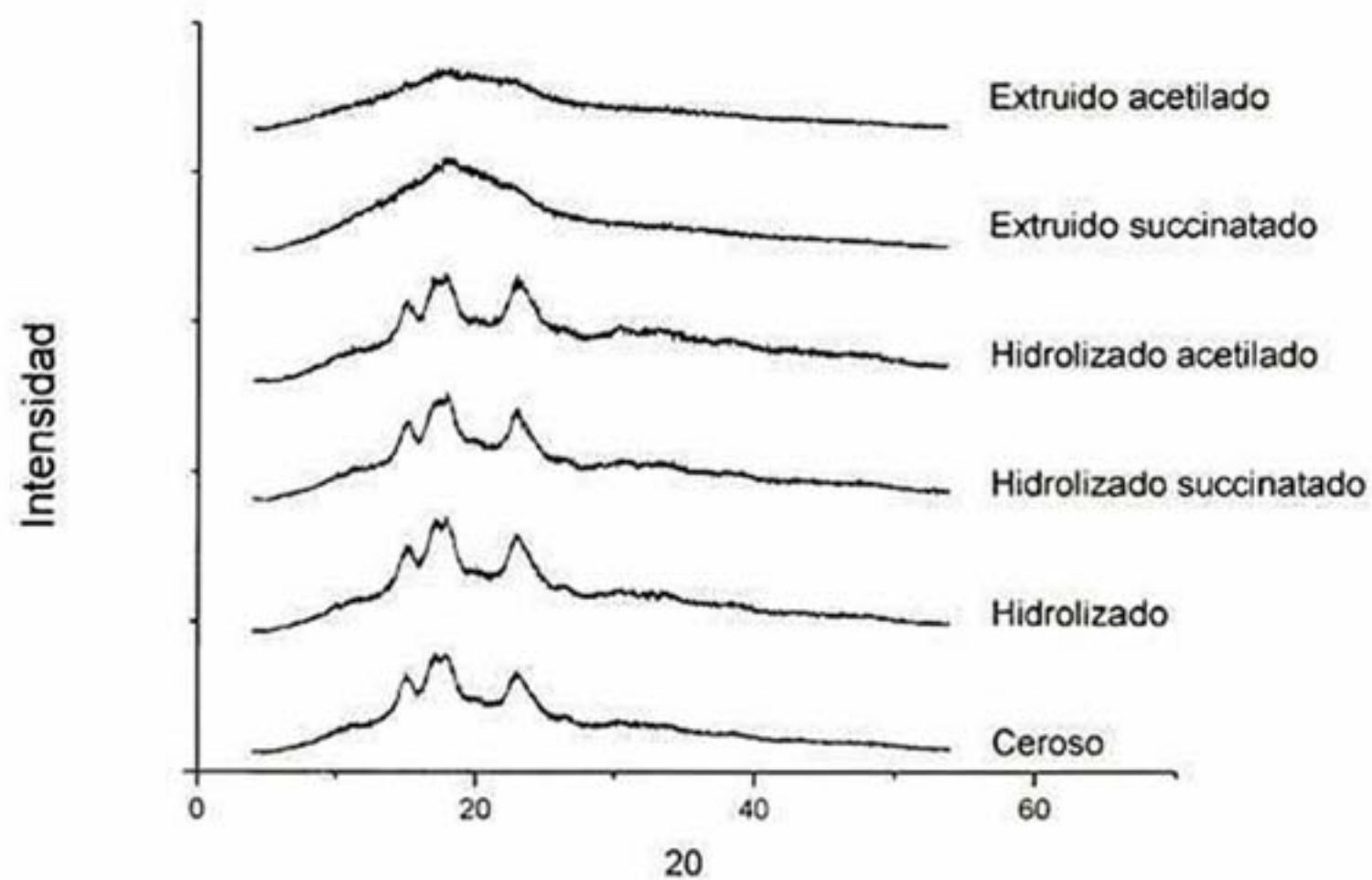


Figura IV. 3. Patrón de difracción de rayos X del almidón de maíz ceroso, almidón de maíz ceroso hidrolizado, almidón de maíz hidrolizado y succinatado, almidón de maíz hidrolizado y acetilado, almidón hidrolizado, succinatado y extrudido, almidón hidrolizado, acetilado y extrudido.

Los difractogramas obtenidos en los almidones nativos y modificados se muestran en las **Figuras IV.2 y IV.3**. El patrón de difracción de los almidones fosfatados es similar al de los acetilados y por lo tanto no se muestran en las figuras. Los almidones nativos (N y W) mostraron un patrón de difracción de tipo A, el cual, es característico de los almidones de los cereales (Cheetham y Tao, 1998). El patrón de difracción tipo A, presenta picos de gran intensidad a: $2\theta = 15^\circ, 17^\circ, 18^\circ$ y 23° . Después de la esterificación de los almidones (NS, NA y NF), mostraron un patrón de difracción de tipo V a: $2\theta = 13.1^\circ, 19.8^\circ$ y uno de baja intensidad a 22.4° , ésto se atribuye a la recristalización de la amilosa durante el proceso de extrusión y/o durante el enfriamiento (Van Soest *et al.*, 1996, Godet *et al.*, 1995). Lo contrario se observó en los almidones cerosos modificados (WS, WA y WF) que presentaron una estructura completamente amorfa (O'Brien *et al.*, 2009).

De acuerdo con nuestros resultados, el grado de cristalinidad influye tanto en la solubilidad en agua y la absorción de agua de los almidones modificados. WSI es mayor en almidones cerosos modificados con relación a los almidones normales modificados porque los primeros son más amorfos. El hinchamiento del gránulo en el agua se debe principalmente a la amilopectina (Diop *et al.*, 2011). Así entonces, en almidones altamente despolimerizados, la amilopectina no puede retener agua en el gránulo.

IV.3.4 Caracterización morfológica de los almidones modificados

En la **Figura IV. 3**, se muestran los almidones modificados. Como se puede observar se perdió la estructura granular del almidón. Los seis tratamientos realizados al almidón de maíz alteraron la apariencia y estructura del gránulo nativo como se muestra en las **Figuras IV.5 (a)-(d)**; se observan partículas de formas irregulares con superficies fragmentadas y rugosas. Los almidones hidrolizados conservaron su estructura granular **Figuras IV. 5 (f) y (g)**. La morfología observada en los almidones modificados corrobora la pérdida de cristalinidad provocada por el proceso de extrusión.

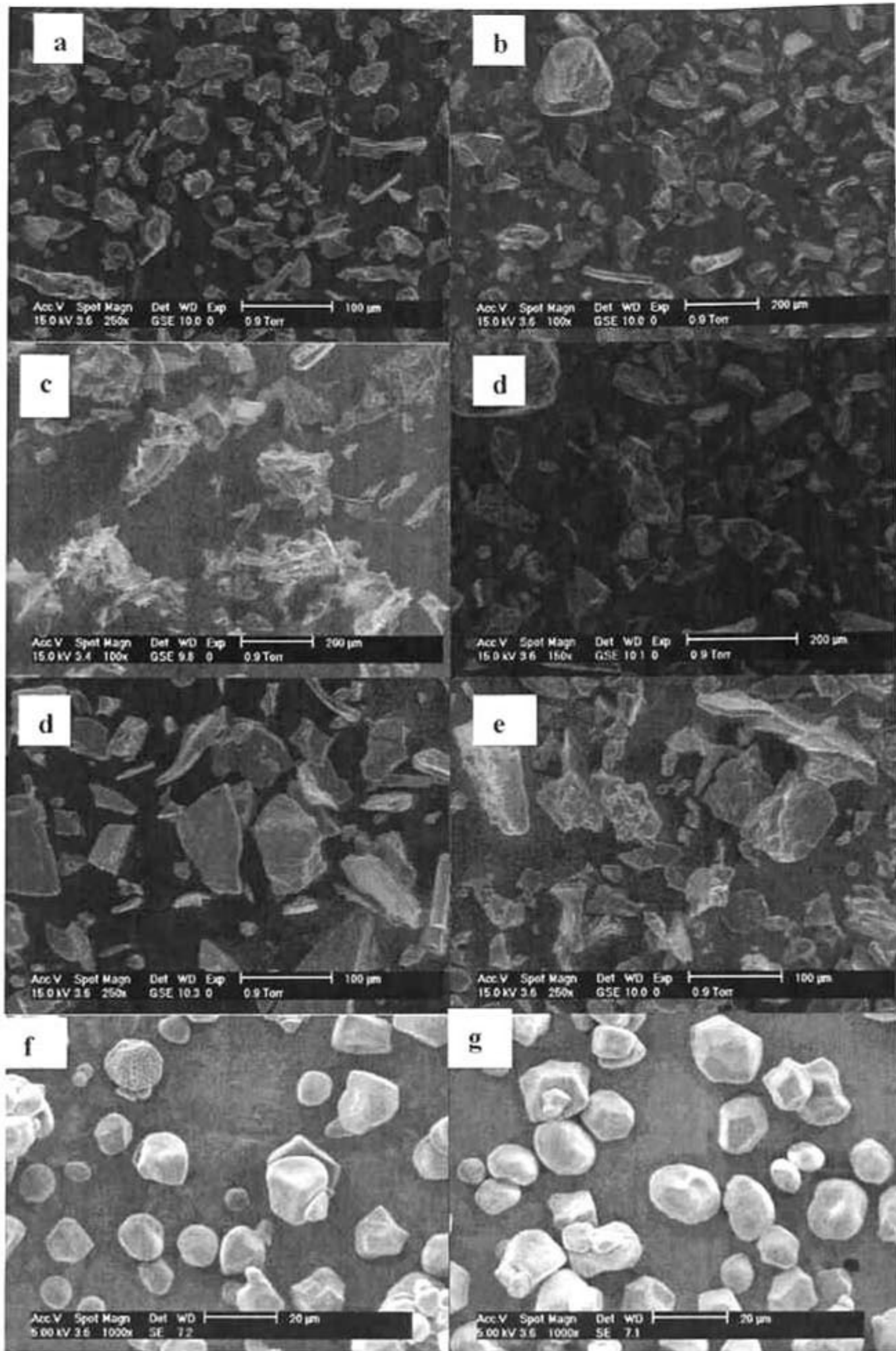


Figura IV. 4. Microfotografías de los almidones de maíz normal y ceroso modificados e hidrolizados: (a) NS, (b) CS, (c) NA, (c)CA, (d) NF, (e) CF, (f) NH, (g) CH.

IV.3.5 Propiedades de empastado

Cuando el almidón es cocido, el comportamiento del flujo de una mezcla de gránulos cambia marcadamente y la suspensión se vuelve una dispersión de gránulos hinchados y gránulos parcialmente desintegrados. Al producto cocido se le denomina una pasta de almidón. El empastado se define como el estado siguiente a la gelatinización del almidón pero anterior a la retrogradación. En general, una pasta de almidón puede ser descrita como un sistema de dos fases, compuesto de una fase dispersa de gránulos hinchados y una fase continua de amilosa lixiviada a partir del granulo (Ring, 1985).

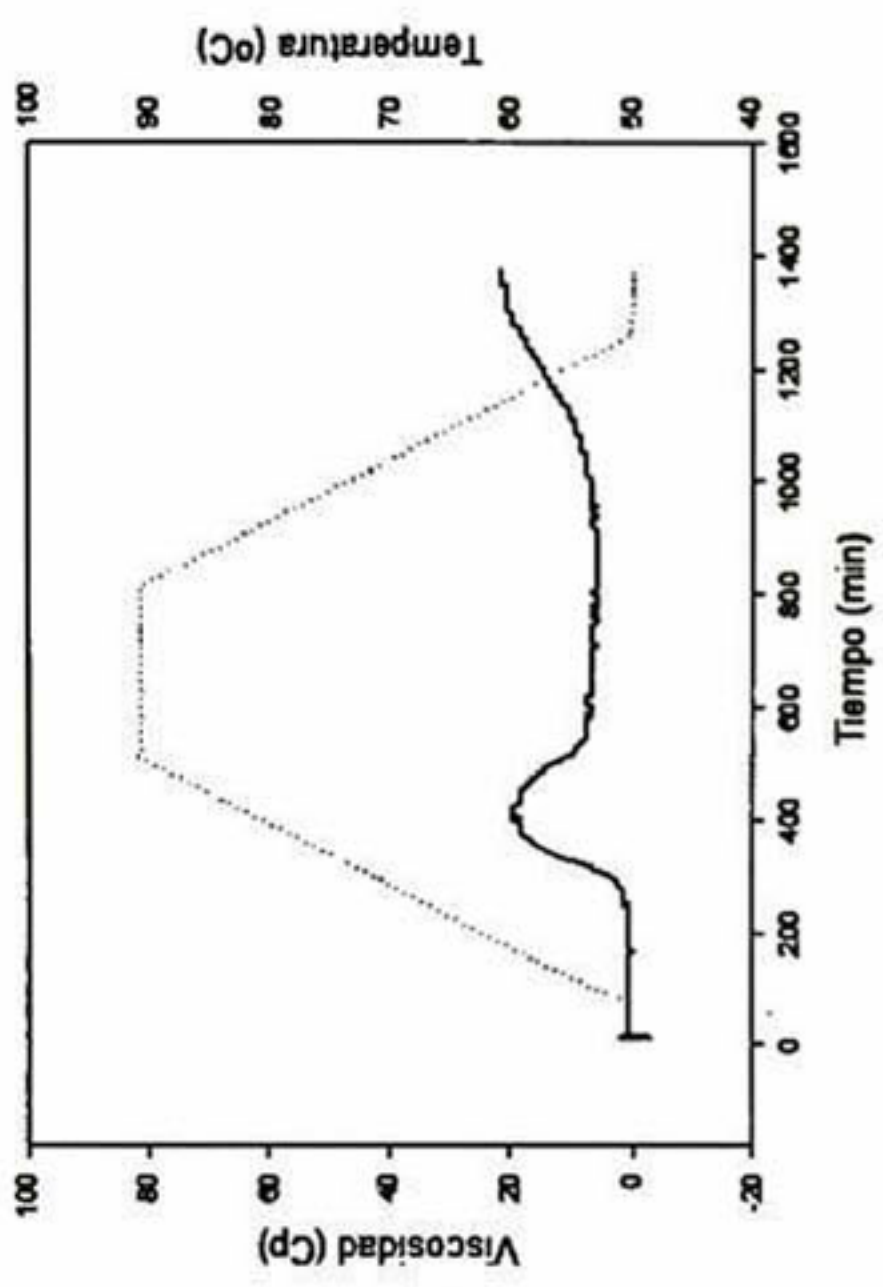
Las propiedades de empastado o de viscosidad de los almidones normales y modificados se encuentran en las **Figuras IV.7-8** y en el **Cuadro IV.5**. En donde P_V es la viscosidad de pico, V_F la viscosidad final y T_e la temperatura de empastado. Se observó que el almidón nativo ceroso presentó un mayor T_p y V_p en comparación con el almidón nativo normal. Esto se debe a que la amilopectina contribuye al hinchamiento del almidón, mientras que la amilosa restringió el hinchamiento; por lo tanto, un almidón con mayor contenido de amilosa tiende a tener una temperatura de empastado más alta. Se observó también una reducción en las propiedades de empastado de los almidones hidrolizados, por ejemplo: el almidón nativo de maíz presentó una temperatura de empastado (T_0) de 73.65 °C y una viscosidad de pico (V_p) de 1765, mientras que almidón hidrolizado con HCl presentó una T_0 de 67.4 °C y una V_p de 20. En el caso del almidón ceroso hidrolizado, éste presentó una reducción más marcada en los parámetros de gelatinización, en comparación con el almidón normal hidrolizado. La disminución en la temperatura de empastado es atribuida a la despolimerización de los componentes estructurales del almidón, que da como consecuencia una organización granular debilitada. Se ha reportado que la hidrólisis ocurre primeramente en la lamela amorfa, conformada en su mayoría por amilosa, la cual es más susceptible a la despolimerización que las cadenas B2 y B3+ de la amilopectina (Kuakpetoon y Wang, 2006). La amilosa degradada ejerce menos inhibición al hinchamiento, por lo tanto la temperatura de empastado de los almidones hidrolizados disminuye. Los almidones modificados presentaron más

bajas viscosidades de pico y finales que los almidones nativos. Con excepción del almidón normal fosfatado, los almidones esterificados no desarrollaron viscosidad. O'Brien y Wang (2009) reportaron que el almidón de maíz normal fosfatado por extrusión mostró la formación de un gel más rígido en comparación que el almidón de maíz ceroso debido a que la amilosa ayuda a formar un gel más poroso, lo cual puede estar promoviendo una mayor viscosidad. Como evidencia de ello, se observó una mayor capacidad de hinchamiento en el almidón normal fosfatado normal que en el fosfatado ceroso (**Cuadro IV. 3.**).

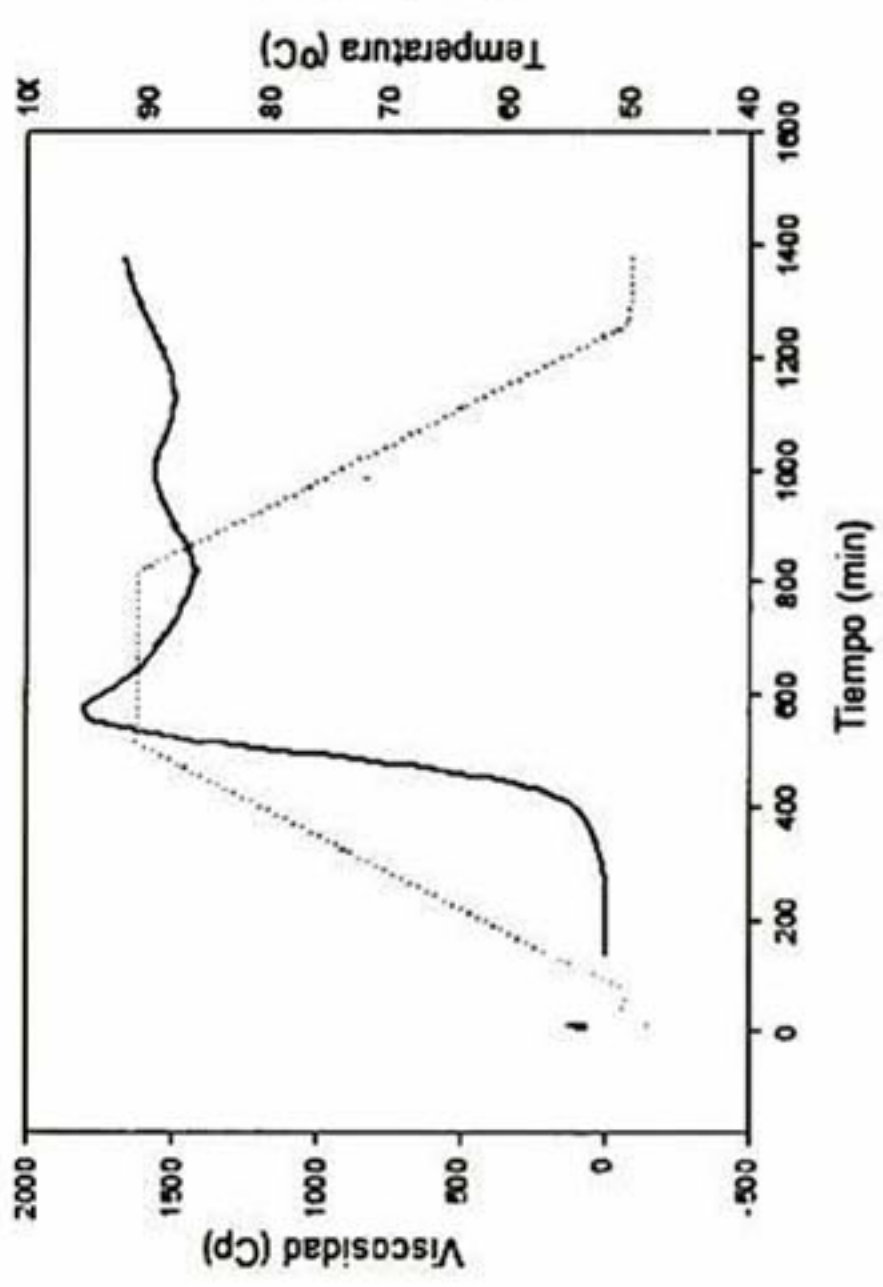
Cuadro IV. 3. Características de viscosidad de pasta de los almidones nativos y modificados

Muestra	Características de viscosidad ¹		
	P _V	V _F	T _e
N	1807	1663	72.15
NH	20.81	22.03	67.40
C	2192	1344	69.2
CH	9	9	61.2
NF	45	38	60.53

¹N: almidón de maíz normal; NH: almidón de maíz normal hidrolizado; C: almidón ceroso de maíz, CH: almidón ceroso de maíz hidrolizado; NF: almidón fosfatado de maíz. P_V: viscosidad de pico; V_F: viscosidad final; T_e: temperatura de empastado.



1



2

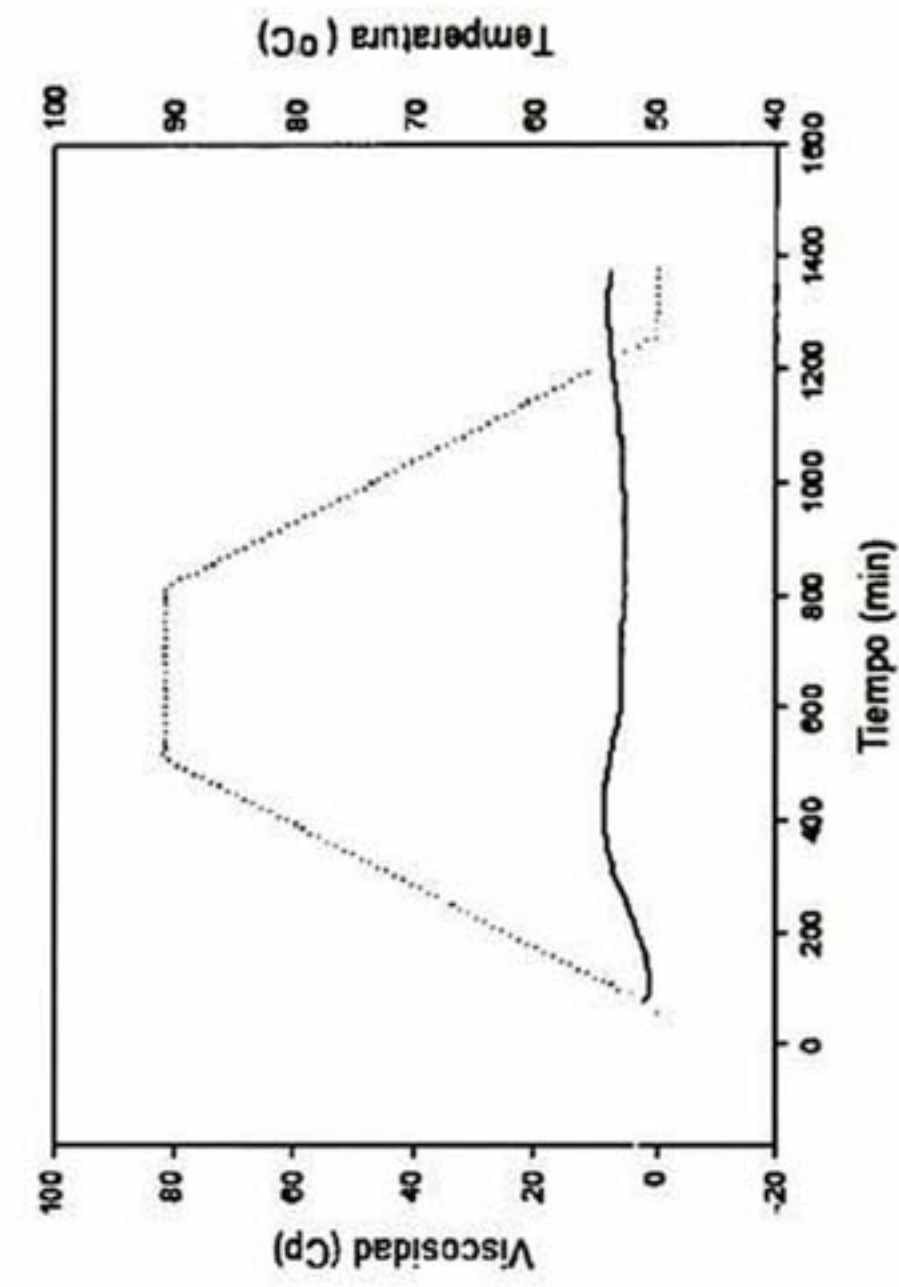
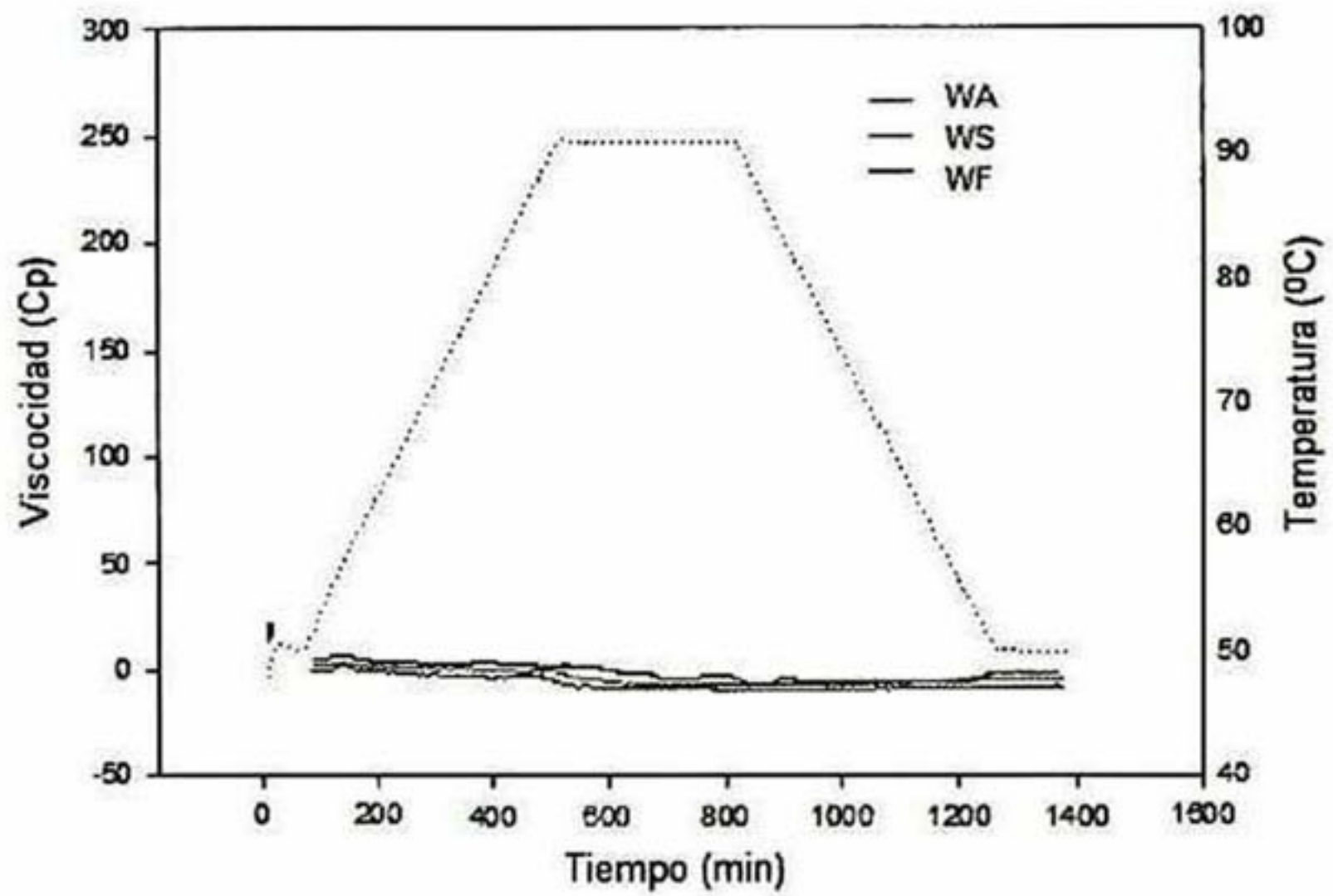
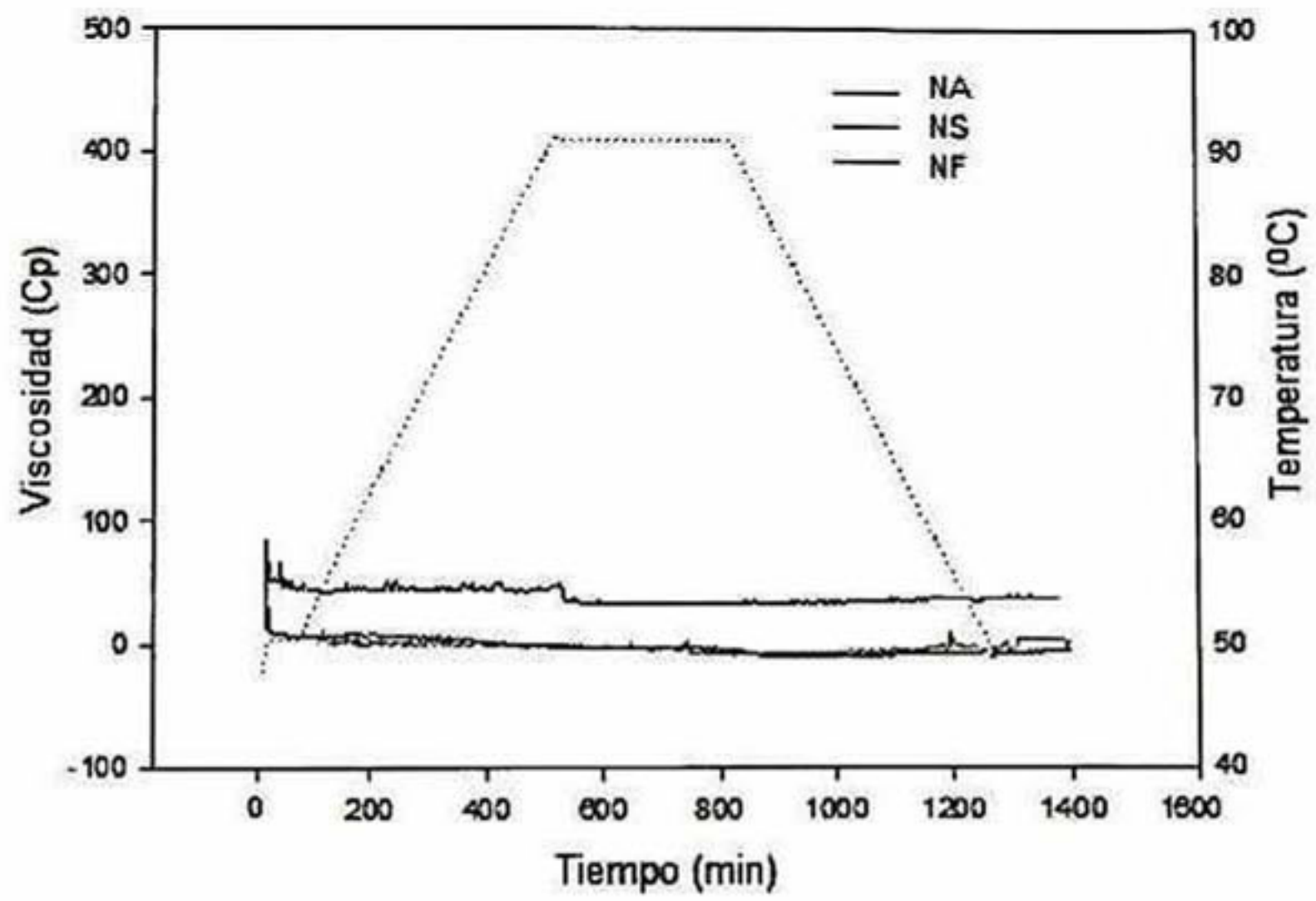


Figura IV. 5. Perfil de viscosidad de los almidones de maíz normal y maíz hidrolizado mediante un ARV.

3



4

5 **Figura IV. 6.** Perfil de viscosidad de los almidones de maíz normal y modificado
 6 por fosfatación, acetilación y succinilación.

IV.4 Conclusiones

- La hidrólisis ácida de los almidones normal y ceroso de maíz, afectó sus propiedades fisicoquímicas, térmicas y morfológicas. Los almidones hidrolizados presentaron una mayor solubilidad y una menor capacidad de hinchamiento. De igual manera presentaron una menor viscosidad.
- Los almidones cerosos esterificados en medio acuoso con anhídridos ó con tripolifosfato de sodio por extrusión, presentaron los más altos grados de sustitución.
- Después de la esterificación de los almidones hidrolizados, se observó en los almidones succinatos y acetilados una disminución en la temperatura de gelatinización, en cambio, en los almidones fosfatados se observó un incremento en la temperatura de gelatinización.
- En los almidones modificados evaluados se observó que sólo el almidón normal fosfatado desarrolló viscosidad.
- La despolimerización de los almidones se vio reflejada en la disminución de la entalpía de gelatinización, la pérdida de cristalinidad, en la disminución en la temperatura de empastado y en la disminución ó pérdida de la viscosidad.
- Los almidones succinatos, acetilados y fosfatados tanto normales como cerosos, presentaron características deseables para ser utilizados como agentes encapsulantes, ya que, presentaron grados de sustitución permisibles por la FDA, alta solubilidad, baja viscosidad y una superficie activada con grupos funcionales.

IV.5 Referencias

- Bangs, W.E., Reineccius, G.A., (1988). Corn starch derivatives: possible wall material for spray-dried flavor manufacture. In: parboiled rice through cross-linking. *Cereal Chemistry*. 51, 46–51.
- Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K., Richling, E., Kulozik, U., (2012). Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Research International*. 47, 51-57.
- Bonilla, E., Azuara, E., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J., (2010). Predicting suitable storage conditions for spray-dried microcapsules formed with different biopolymer matrices. *Food Hydrocolloids*. 24, 633-640.
- Brouillard, R., Delaporte, B., (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*. 99, 8461-8468.
- Burin, V.M., Rossa, P.N., Ferreira-Lima, N.E., Hillmann, M.C.R., Boirdignon-Luiz, M.T., (2011). Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science Technology*. 46, 186-193.
- Cai, Y.Z., Corke, H., (2000). Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*. 65, 1248-1252.
- Çam, M., İçyer, N.C., Erdoğan, F., (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*. 55, 117-123.
- Cao, S., Liu, L., Pan, S., Lu, Q., Xu, X., (2009). A Comparison of Two Determination Methods for Studying Degradation Kinetics of the Major Anthocyanins from Blood Orange. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 245-249.
- Chang, P.R., Xie, Y., Wu, D., Ma, X., (2011). Amylose wrapped halloysite nanotubes. *Carbohydrate Polymers*. 84, 1426-1429.
- Chang, Y.H., Lii, C.Y., (1992). Preparation of starch phosphates by extrusion. *Journal of Food Science*. 57, 203–205.
- Cladera-Olivera, F., Marczak, L.D.F., Noreña, C.P.Z., Pettermann, A.C., (2011). Modeling water adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) flour and thermodynamic analysis of the adsorption process. *Journal of Food Process Engineering*. 34, 826-843.
- Cova, A., Sandoval, A.J., Balsamo, V., Müller, A.J., (2010). The effect of hydrophobic modifications on the adsorption isotherms of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*. 81, 660-667.
- Da Silva, F.C., da Fonseca, C.R., de Alencar, S.M., Thomazini, M., Balieiro, J.C.d.C., Pittia, P., Favaro-Trindade, C.S., (2013). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food Bioproducts Processing*. 91, 28-36.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., Marin-Arroyo, M., (2013). Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a

- Mixture Design of Experiments. *Food and Bioprocess Technology*. 6, 941-951.
- Fang, J.M., Fowler, P.A., Sayers, C., Williams, P.A., (2004). The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*. 55, 283-289.
- Fang, Z., Bhandari, B., (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*. 129, 1139-1147.
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., Omid, M., (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food Bioproducts Processing*. 90, 667-675.
- Ferrari, C.C., Germer, S.P.M., Alvim, I.D., Vissotto, F.Z., de Aguirre, J.M., (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science Technology* 47, 1237-1245.
- Frascareli, E.C., Silva, V.M., Tonon, R.V., Hubinger, M.D., (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food Bioproducts Processing*. 90, 413-424.
- Gabas, A.L., Telis, V.R.N., Sobral, P.J.A., Telis-Romero, J., (2007). Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*. 82, 246-252.
- Higley J. S., Love S. L., Price W. J., Nelson J. E. and Huber K. C. (2003). The rapid visco analyzer (RVA) as a tool for differentiating potato cultivar son the basis of flour pasting properties. *American Journal of Potato Research*. 80, 195-206.
- Jeirani, Z., Mohamed Jan, B., Si Ali, B., Mohd. Noor, I., Chun Hwa, S., Saphanuchart, W., (2012). The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemometrics Intellig. Lab. Syst.* 112, 1-7.
- Kanakdande, D., Bhosale, R., Singhal, R.S., (2007). Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers*. 67, 536-541.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design* 90, 622-632.
- Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R.S., (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*. 61, 95-102.
- Liang, R., Huang, Q., Ma, J., Shoemaker, C.F., Zhong, F., (2013). Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried beta-carotene nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*. 33, 225-233.
- Madruca, M.S., de Albuquerque, F.S.M., Silva, I.R.A., do Amaral, D.S., Magnani, M., Queiroga Neto, V., (2014). Chemical, morphological and functional properties of Brazilian jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) seeds starch. *Food Chemistry*. 143, 440-445.
- Martinelli, L., Gabas, A.L., Telis-Romero, J., (2007). Thermodynamic and Quality Properties of Lemon Juice Powder as Affected by Maltodextrin and Arabic Gum. *Drying Technology*. 25, 2035-2045.

- Nagaoka, S., Tobata, H., Takiguchi, Y., Satoh, T., Sakurai, T., Takafuji, M., Ihara, H., (2005). Characterization of cellulose microbeads prepared by a viscose-phase-separation method and their chemical modification with acid anhydride. *Journal of Applied Polymer Science*. 97, 149-157.
- Nijdam, J.J., Langrish, T.A.G., (2006). The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering*. 77, 919-925.
- O'Brien, S., Wang, Y., (2009). Effects of shear and pH on starch phosphates prepared by reactive extrusion as a sustained release agent. *Carbohydrate Polymers*. 77, 464-471.
- Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., Morales, A.L., (2010). Microencapsulation by Spray-Drying of Anthocyanin Pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 6977-6985.
- Osorio, C., Forero, D.P., Carriazo, J.G., (2011). Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. *Food Research International*. 44, 1174-1181.
- Pang, S.F., Yusoff, M.M., Gimbin, J., (2014). Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Food Hydrocolloids*. 37, 159-165.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y., Zhao, G., (2013). Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. *LWT - Food Science and Technology*. 51, 348-355.
- R.L. (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Springer, Berlin. pp. 311.
- Risch, S.J., Reineccius, G.A. (Eds.), *Flavor Encapsulation*. American Chemical Society, pp. 12-28.
- Ring S. G. 1985. Some studies on starch gelation. *Starch-Starke*, 37: 80-83.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C., (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science Technology* 45, 1386-1394.
- Rutledge, J. E., Islam, M. N., James, W. H. (1974). Improved canning stability of
- Rutledge, J. E., Islam, M. N., James, W. H. (1972). Improved canning stability of rice by chemical modification. *Cereal Chem.*, 49, 430-436.
- Saenz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P., (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. 114, 616-622.
- Sandoval-Aldana A., Rodriguez-Sandoval E. y Fernandez-Quintero A. (2005). Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna*, 72, 45-53.
- Smith, R.J., Caruso, J.L., (1964). Determination of phosphorus and ash. In: Whistler, R.L. (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Springer, Berlin. pp. 311.
- Spada, J.C., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C., (2012). Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*. 89, 1166-1173.
- Su, Y.L., Fu, Z.Y., Zhang, J.Y., Wang, W.M., Wang, H., Wang, Y.C., Zhang, Q.J., (2008). Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*. 184, 114-121.

- Thirathumthavorn, D., Charoenrein, S., (2006). Thermal and pasting properties of native and acid-treated starches derivatized by 1-octenyl succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers*. 66, 258-265.
- Thys, R.C.S., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Aires, A.G., Cladera-Olivera, F., (2010). Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. *Journal of Food Engineering*. 100, 468-473.
- Tonon, R.V., Alexandre, D., Hubinger, M.D., Cunha, R.L., (2009). Steady and dynamic shear rheological properties of açai pulp (*Euterpe oleraceae* Mart.). *Journal of Food Engineering*. 92, 425-431.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 88, 411-418.
- Verdalet-Guzman, I., Martinez-Ortiz, L., Martinez-Bustos, F., (2013). Characterization of new sources of derivative starches as wall materials of essential oil by spray drying. *Food Science Technology*. 33, 757-764.
- Włodarczyk-Stasiak, M., Jamroz, J., (2008). Analysis of sorption properties of starch-protein extrudates with the use of water vapour. *Journal of Food Engineering*. 85, 580-589.
- Xu, B., Chang, S.K.C., (2008). Total Phenolics, Phenolic Acids, Isoflavones, and Anthocyanins and Antioxidant Properties of Yellow and Black Soybeans As Affected by Thermal Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 7165-7175.
- Xu, Y., Miladinov, V., Hanna, M.A., (2004). Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution¹. *Cereal Chemistry Journal* 81, 735-740.

V. SELECCIÓN DE CONDICIONES OPERATIVAS DEL PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN (ANÁLISIS PRELIMINAR)

V.1 *Introducción*

El maíz negro representa una importante fuente de antocianinas y principalmente se utiliza para la elaboración de atole y para la elaboración de ornamentos tradicionales, principalmente. Como se ha mencionado anteriormente las antocianinas son inestables durante los tratamientos térmicos, por lo tanto, los estudios de las operaciones de secado por aspersion son importantes para lograr una mejor estabilidad de los pigmentos microencapsulados. La producción de microesferas mediante secado por aspersion implica la formación de una emulsion que contiene el material de pared y el compuesto bioactivo, seguido por la atomización de esta emulsion en una cámara de secado con circulación de aire caliente. Uno de los pasos clave en la encapsulación mediante secado por aspersion es la preparación de la emulsion, ésta desempeña un papel importante en la eficiencia de la microencapsulación. Los parámetros significativos que se deben de considerar en la formación de la emulsion son: el contenido de sólidos, la concentración del compuesto bioactivo, la viscosidad de la emulsion, el tamaño de partícula y el método de emulsificación. Si la emulsion es suficientemente estable y presenta condiciones óptimas de viscosidad y tamaño de partícula, entonces la eficiencia de encapsulación puede ser maximizada por la elección correcta de los parámetros de secado por aspersion, incluyendo temperaturas de entrada y salida de aire, temperatura de la emulsion, las condiciones de atomización (Jafari *et al.*, 2008b). Por lo tanto, es importante para optimizar el proceso de secado, con el fin de obtener una mayor eficiencia de microencapsulación (Frascareli *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de las temperaturas de secado y de la concentración de material de pared en microesferas producidas con el extracto de maíz negro, utilizando almidón fosfatado como material de pared.

V.2 *Materiales y métodos*

Se utilizó almidón fosfatado por extrusión con un contenido de 0.22 % de fósforo y un grado de sustitución de 0.011 preparado como se describe en la sección IV.

V.2.1 **Secado por aspersión**

Se preparó la mezcla de alimentación mediante la disolución de 10, 15 ó 20 gramos de almidón fosfatado en agua a 40 °C y se mezclaron con 20 ml de extracto resuspendido de antocianinas (0.318 mg/ml de cianidina-3-glucósido), que se dispersaron de forma individual con la ayuda de una cuchara de plástico. La emulsión se formó en un homogeneizador de alta presión Ultraturrax 14.000 rpm x g durante 4 minutos (Ultra Turrax T-25-SI, IKA Works, EE.UU.). La emulsión resultante se secó en un secador por aspersión LabPlan-SD básico (Huddersfield, Reino Unido), con diámetro de boquilla de 0.5 mm; y una tasa de flujo de líquido de 10 ml / min y. Las condiciones de secado se presentan en el **Cuadro V.1**. La temperatura de aire de entrada varió desde 130 hasta 170 °C \pm 1, la concentración de material de la pared varió del 10 al 20 % en peso y la temperatura del aire de salida de 85 \pm 5 °C para todos los tratamientos. La cuantificación del contenido total de antocianinas se determinó por el método pH-diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001) utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda 2S UV VIS) a 510 nm, y 700 nm. El cálculo se realizó en base a la cianidina-3-glucósido, usando el coeficiente de extinción de 26,900 L⁻¹ mg⁻¹ cm, y un peso molecular de 449.2 g / l. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm longitud.

V.2.2 **Espectroscopía RAMAN**

El espectro Raman del almidón fosfatado fue obtenido utilizando un micro-Raman spectrometer (Dilor, model Labram II, USA) equipado con un HeNe de luz laser a $\lambda_{\text{HeNe}}=632.8$ nm a 20mW y un Filtro de densidad neutro a una potencia de atenuacion de 10mW, a esta longitud de onda no se observa una señal fluorescente en los almidones. El micro-Raman espectrométero está acoplado a un microscopio óptico Olympus BX40, con un objetivo de 50X que produce un rayo de 2 μ m diámetro y una

rejilla de difracción de 1800g/mm sobre la muestra. La medición se realizó en un barrido de longitud de onda de 0 a 2000 cm^{-1}

Cuadro V. 1. Condiciones experimentales empleadas para el procedimiento de microencapsulación.

Material de pared	T_c ($^{\circ}\text{C}$)	Cd-3-glu mg/g de microesferas
10	130	0.636
10	150	0.636
10	170	0.636
15	130	0.454
15	150	0.454
15	170	0.454
20	130	0.353
20	150	0.353
20	170	0.353

Cd-3-glu: cianidina 3 glucósido

V.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología externa de las microesferas se evaluó mediante microscopía laser con un microscopio LEXT OLS4000 3D y mediante microscopía electrónica de barrido (ESEM EDAX, detector de GSE, Holanda), usando un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras fueron fijadas en una cinta metálica adhesiva de doble cara. El software utilizado para la determinación del diámetro de las microesferas a través del procesamiento de las imágenes es ImageJ (basado en 130 partículas), que es un programa de análisis desarrollado en los Institutos Nacionales de Salud (NIH), EE.UU. (Rasband, 2007).

V.2.4 Color

El color de las microesferas de antocianina se midió utilizando un colorímetro Hunter Lab (MiniScan Hunter Lab, modelo 45 / 0L, Hunter Associates Lab., Ind., EE.UU.), las mediciones de color se expresan en términos de luminosidad L^* ($L^* = 0$ para el negro y $L^* = 100$ para el blanco) y el parámetro a^* [verde (-) a rojo (+)]. Las mediciones se realizaron por triplicado y se realizaron tres lecturas para cada réplica.

V.2.5 Rendimiento de la encapsulación (RE)

El rendimiento del proceso de microencapsulación (RE) se calculó como la relación de la masa en base seca de las microesferas obtenidas al final del proceso y la masa inicial de las sustancias en la solución de alimentación y se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula (Çam *et al.*, 2014).

$$RE = \frac{\text{Peso de las microcápsulas (g)}}{\text{Peso de la emulsión (g)}} \times 100$$

V.2.6 Retención de antocianinas después del secado por aspersion

$$RA = \frac{TAC_e}{TAC_t} \times 100\%$$

Donde TAC_e es el contenido de antocianinas totales obtenido experimentalmente, expresado en mg/g de microesferas y TAC_t es el contenido de antocianinas totales calculadas teóricamente expresado en mg/g de microesferas.

V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

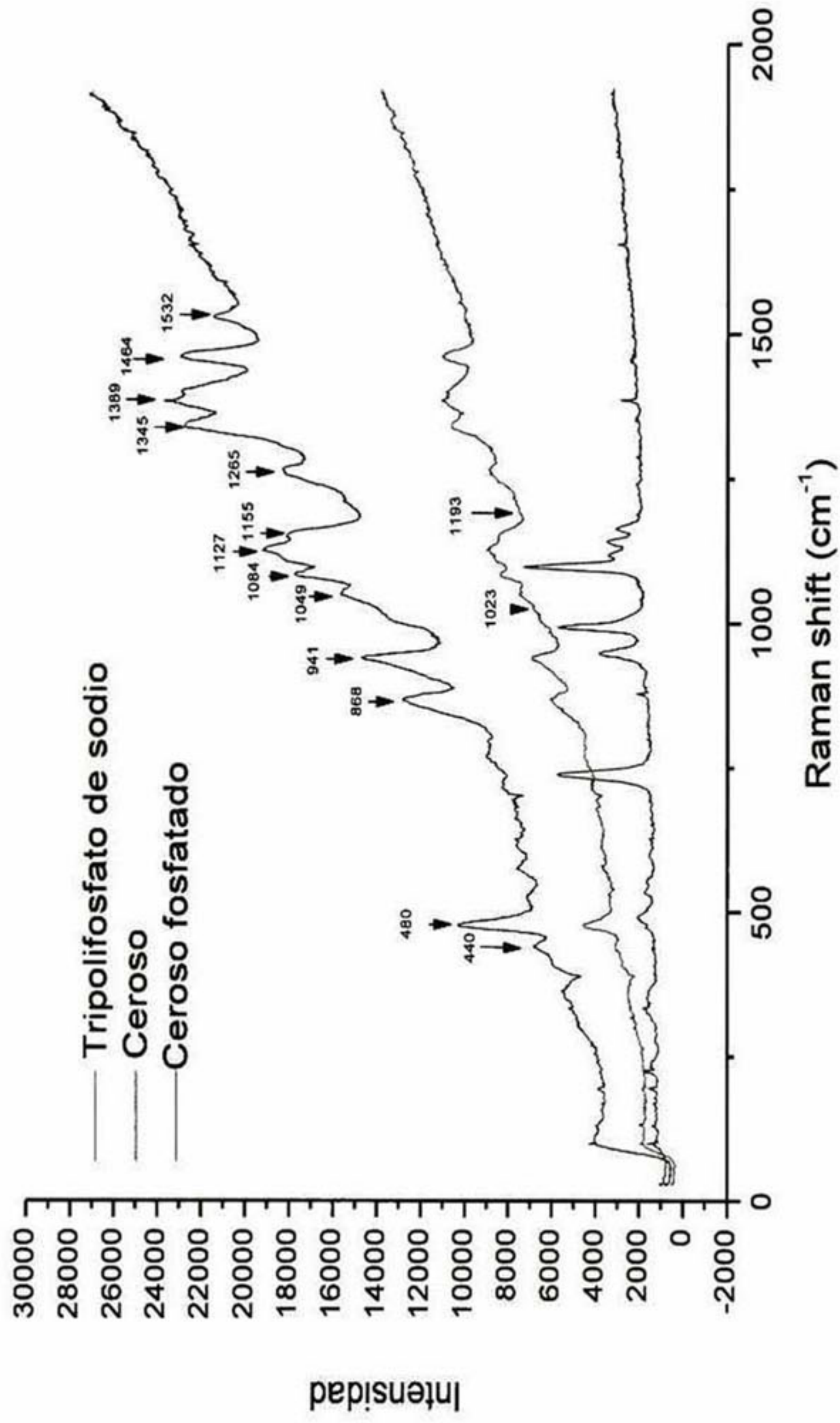
V.3.1 Espectroscopía RAMAN de los almidones fosfatados

No fue posible la detección de grupos fosfato mediante la técnica de FTIR y por ello se utilizó la espectroscopía RAMAN para la caracterización del almidón fosfatado. En la **Figura V.1**, se observaron cambios en las intensidades de las señales del espectro RAMAN después de la modificación, como la disminución de la señal atribuida a los enlaces C-C-C y C-O-C del anillo de glucosa a 863 cm^{-1} , de igual manera la banda a 940 cm^{-1} , responsable de los enlaces de flexión C-O-C, C-O-H y estiramiento CO de los enlaces glucosídicos disminuyó su intensidad después de la fosfatación, que pudo deberse a la despolimerización provocada durante el proceso de cizallamiento; además pudo ser acompañado por una gelatinización puesto que se observó una intensa banda a 477 cm^{-1} junto a un hombro a 492 cm^{-1} , atribuida a la flexión C-C-C y a la torsión del enlace C-O, la cual, disminuye su intensidad después de la fosfatación. Se observa además una disminución en la intensidad a 1078 cm^{-1} atribuida a los grupos C-O-H después de la fosfatación, lo cual puede deberse a la

sustitución de grupos OH por grupos fosfato ya que aparece una nueva banda a 1090 cm^{-1} que puede deberse al anión $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ que absorbe fuertemente a 1095 cm^{-1} en el espectro del TPS, esto se confirma con la banda a 732 cm^{-1} que se debe al enlace P-O-P. Aparece una nueva señal a 1160 cm^{-1} que puede deberse al anión PO_3^-Na^+

Cuadro V. 2. Bandas de absorción RAMAN observadas en el espectro del almidón de maíz ceroso fosfatado

Longitud	señal	asignación
1460	S	CH, CH ₂ , C-O-H flexión
1391	S	C-C-H flexión
1337	S	C-O estiramiento; C-O-H
1260	M	C-C-H, O-C-H, C-O-H
1122	S	C-O, C-C estiramiento; C-O-
1078	M	C-O, C-C estiramiento; C-O-
1042	M	C-O, C-C estiramiento; C-O-
940	S	C-O-C, C-O-H flexión; CO
863	S	C-C-H, C-O-C flexión
714	W	C-C-O flexión
477	S	C-C-C flexión; C-O
353	W	



1
2 **Figura V. 1.** Espectro Raman del almidón nativo ceroso, del almidón fosfatado y del tripolifosfato de sodio.

V.3.2 Morfología y tamaño de las microesferas

Las micrografías de las microesferas de antocianinas preparadas con diferentes condiciones de operación se muestran en la **Figura V. 2. (a-i)**. Las observaciones de SEM mostraron algunas microesferas principalmente esféricas con superficies rugosas o con hendiduras. La morfología fue similar a la observada en microesferas de polifenoles extraídos de *Orthosiphon stamineus* encapsuladas con maltodextrina (Pang *et al.*, 2014). La formación de estas indentaciones en la superficie de las partículas obtenidas mediante secado por aspersión se suele atribuir a la contracción de éstas debido a la pérdida drástica de la humedad seguido de enfriamiento (Saénz *et al.*, 2009, Tonon *et al.*, 2009, Krishnaiah *et al.*, 2012). De acuerdo con Ferrari *et al.*, (2012), las partículas con superficies rugosas probablemente contribuyen al aumento en los valores de humedad y a la menor retención de pigmentos. Además, según Silva *et al.* (2013), las microesferas con superficies rugosas tienen mayor zonas de contacto con relación a las que tienen superficies lisas, y pueden hacerlas más susceptibles a reacciones de degradación, tales como la oxidación.

Cuando la temperatura de secado fue de 130 °C, pocas microesferas lisas se pudieron observar en la **Figura V.2: (a), (d) y (g)**, sin embargo, cuando la temperatura aumentó de 130 a 170 °C, se observaron microesferas claramente más lisas (**Figura V.2: (c), (f) y (i)**). El análisis estructural reveló que había muchas microesferas con rupturas elaboradas con 10 y 15 % de sólidos, aunque las microesferas preparadas con 20 % de sólidos no presentaron microesferas rotas. El aumento en la concentración de sólidos promueve el aumento de la viscosidad de la emulsión (Su *et al.*, 2008). Los efectos en la temperatura de entrada de aire (130 - 170 °C) y contenido en sólidos (10 - 20 %) no presentaron influencia en el tamaño de partícula de las microesferas. De acuerdo con el **Cuadro V. 3**, el diámetro medio de partícula varió 6.27 a 6.65 µm, estos valores fueron ligeramente más altos en comparación con los 4.82 µm, valor obtenido para las microesferas de *Morinda citrifolia* producidas con maltodextrina (Krishnaiah *et al.*, 2012) y más bajo que 12.67 µm, valor reportado para microesferas de açaí producidos con almidón de tapioca (Tonon *et al.*, 2010). Los mencionados autores relacionan el tamaño del diámetro de las

microesferas al tamaño de partícula del material de pared. En general, todas las muestras analizadas mostraron una distribución de tamaño de partícula similar. En contraste con el presente trabajo, Frascareli *et al.*, (2012) observaron que los aumentos de concentración de sólidos (10 – 40 %) resultaron en un incremento del diámetro promedio de las partículas y los autores no observaron efectos en la temperatura del aire de entrada (150 - 190 °C) sobre el diámetro de partícula.

Cuadro V. 3. Efectos de la temperatura de entrada y contenido de sólidos en las microesferas

	T(°C)	µm	RE (%)	EE	L	a
10	130	6.64±3.97	25.67± 1.82 ^b	78.27 ± 0.61 ^a	69.38±0.00 ^a	12.82±0.01 ^a
10	150	6.26±3.94	35.82± 3.10 ^{bc}	68.45 ± 1.43 ^b	70.13±0.01 ^b	12.26±0.03 ^b
10	170	6.65±3.81	43.88± 4.42 ^{ad}	67.52 ± 0.88 ^b	70.32±0.02 ^b	12.36±0.01 ^c
15	130	6.27±2.70	35.29± 3.43 ^{abc}	89.88 ± 0.34 ^c	68.50±0.00	12.02±0.1
15	150	5.42±2.70	42.56± 3.14 ^{ad}	89.54 ± 0.63 ^c	71.98±0.00 ^d	11.64±0.01 ^e
15	170	6.65±3.21	45.21± 6.67 ^{ad}	84.92 ± 1.12 ^d	71.63±0.01 ^e	11.47±0.02 ^f
20	130	6.28±3.43	36.77± 3.12 ^{bc}	96.25 ± 0.78 ^e	73.42±0.02 ^f	12.39±0.02 ^c
20	150	6.25±3.95	38.08± 3.08 ^c	94.33 ± 1.56 ^{ce}	74.19±0.07 ^g	11.15±0.06 ^g
20	170	6.56±4.20	49.11 ± 2.23 ^d	87.63 ± 1.48 ^d	73.93±0.2 ^h	10.77±0.06 ^h

¹Media aritmética de tres repeticiones ± error estándar. Letras iguales dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

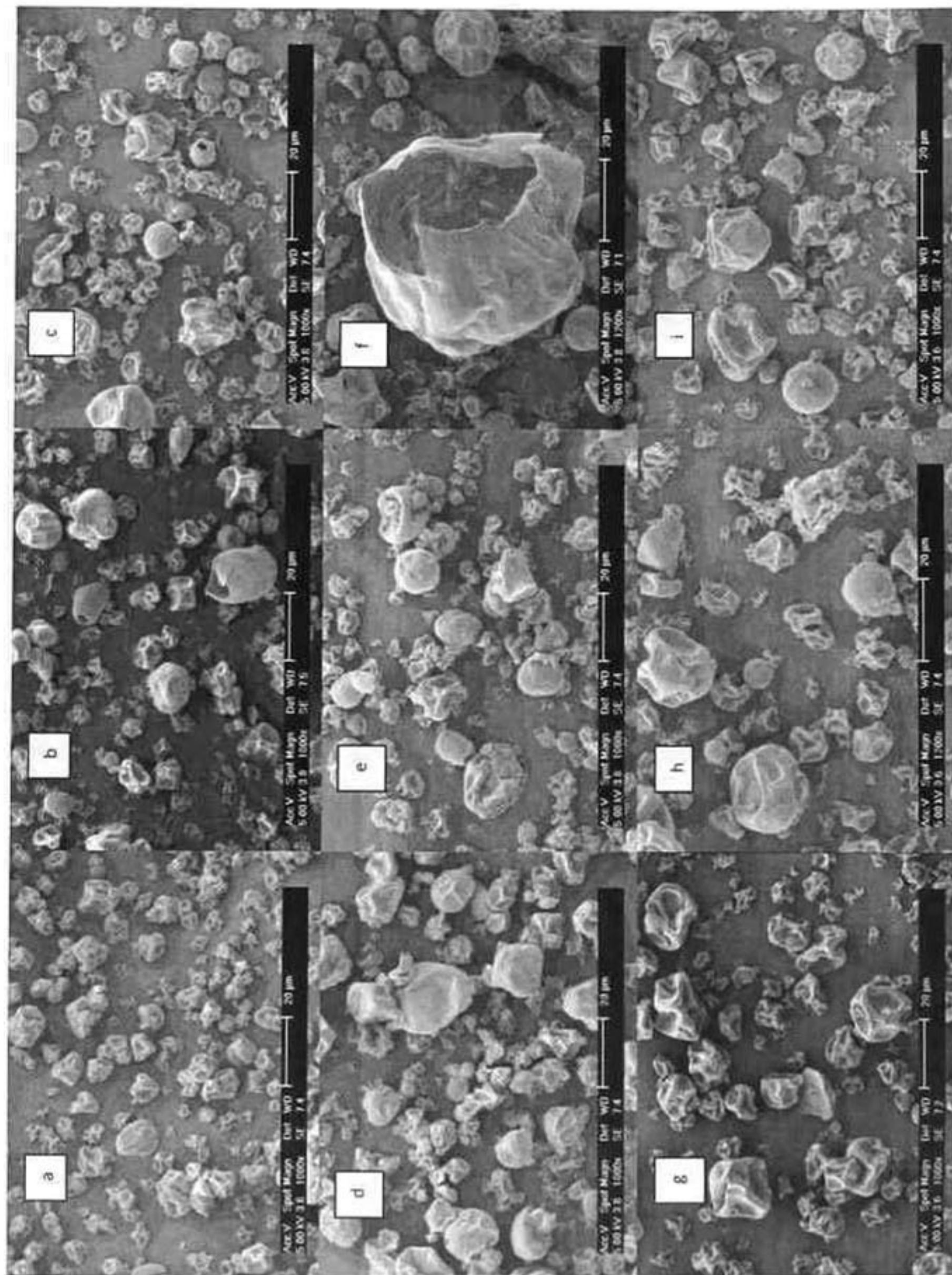


Figura V. 2. SEM de Microesferas preparadas con almidón fosfatado con: (a) 10 % at 130 °C, (b) 10 % at 150 °C, (c) 10 % at 170 °C, (d) 15 % at 130 °C, (e) 15 % at 150 °C, (f) 15 % at 170 °C, (g) 20 % at 130 °C, (h) 20 % at 150 °C and (i) 20 % at 170 °C.

V.3.3 Color de las microesferas

Los parámetros de color de las microesferas producidas con los diferentes agentes encapsulantes se presentan en el **Cuadro V.3**. Los valores L^* y a^* dependen de la concentración de antocianinas; a valores más bajos, mayor concentración de antocianinas. Los valores obtenidos para L^* en este trabajo oscilaron entre 68.5 y 74.1, siendo microesferas producidas con 20 % de sólidos, los valores más altos y las microesferas producidas con 10 % de sólidos los valores más bajos. Una baja concentración de material le confiere al producto una coloración oscura. Ferrari et al (2012) reportaron que un aumento en la concentración de maltodextrinas aumentó el valor L^* en la encapsulación de extracto de mora, lo cual provocó con un efecto de dilución ocasionado por la adición de maltodextrinas. Las microesferas producidas con 10 % de sólidos, mostraron los más altos valores en el valor rojo (a^*).

V.3.4 Efecto de las condiciones de procesamiento en la retención de antocianinas (RA) y en la eficiencia de encapsulación (EE) de las antocianinas.

Se evaluaron los efectos de la temperatura y el contenido de sólidos en el proceso de microencapsulación de antocianinas. Para ello se evaluaron la RA y EE bajo las diferentes condiciones de operación que se muestran en el **Cuadro V.3**. El valor de RE fue superior a mayores temperaturas de secado a la entrada (170 °C) con relación a temperaturas más bajas de entrada de aire (150 y 170 °C) (**Cuadro V.3**), si la temperatura de entrada es baja, no habrá la suficiente cantidad de calor para secar el producto y por lo tanto una cantidad de remanente de humedad quedará en el producto, y las microesferas húmedas se adherirán fácilmente en la pared de la cámara. Generalmente, únicamente los polvos colectados en el contenedor son considerados como efectivos por lo que la humedad provoca la disminución de las antocianinas (Su *et al.*, 2008). Se observó un valor máximo en la retención de antocianinas (RA) cuando las microesferas se secaron a 20 % de sólidos y 170 °C (49.11 %) y no se observaron diferencias significativas en comparación con las que se secaron a: 10 % a 170 °C, y 15 % a 150 °C y 170 °C. los valores obtenidos fueron

similares en comparación con 39.5 a 47.7 %, valores reportados de RA en el mismo intervalo de temperatura (Çam *et al.*, 2014).

Las antocianinas son sensibles a las altas temperaturas y el aumento de la temperatura llevó a una menor EE. Con 10 % de contenido de sólidos, con el aumento de temperatura de 130 a 150 °C, EE disminuyó significativamente y no se observaron diferencias significativas entre 150 y 170 °C. Sin embargo, a los 15 y 20 % de sólidos se observó una disminución significativa en EE cuando la temperatura de entrada fue mayor a 150 °C. A mayor concentración de almidón mejor es la protección de antocianinas durante el proceso de secado por aspersión. A altos contenidos de sólidos se mejora la eficiencia de encapsulación de antocianinas debido a un mayor empaquetamiento molecular, que sirve para inhibir la difusión del oxígeno molecular durante el secado de las partículas (Çam *et al.*, 2014).

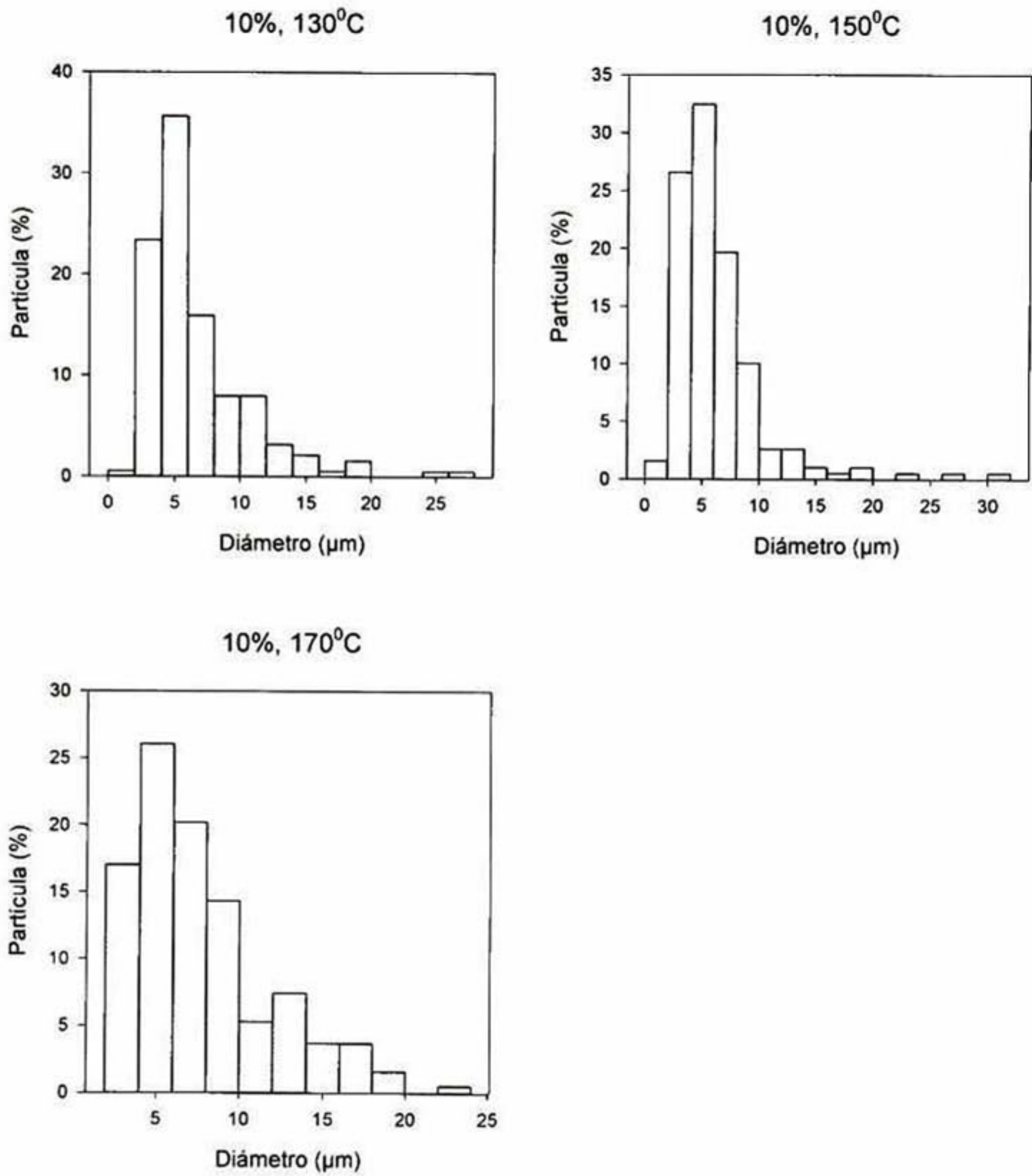


Figura V. 3. Distribución del tamaño de partícula de las microsferas producidas con 10 % de sólidos a 130, 150 y 170 °C.

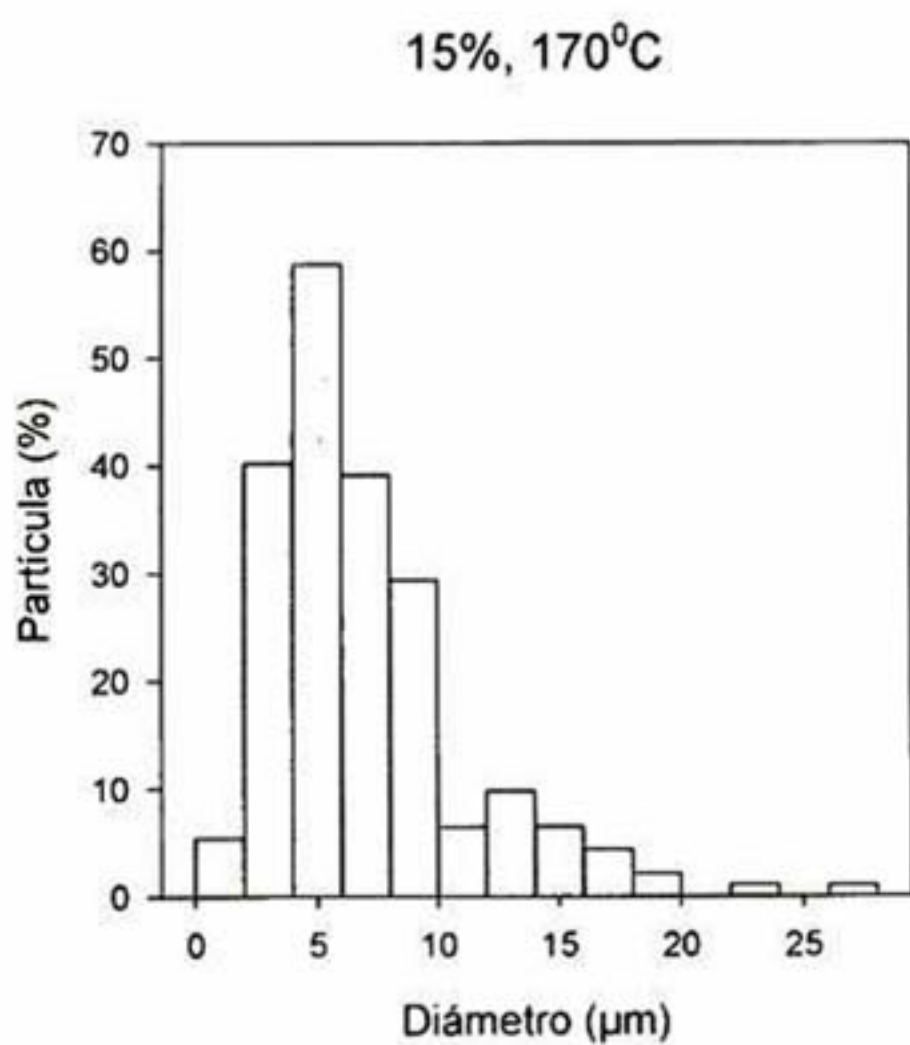
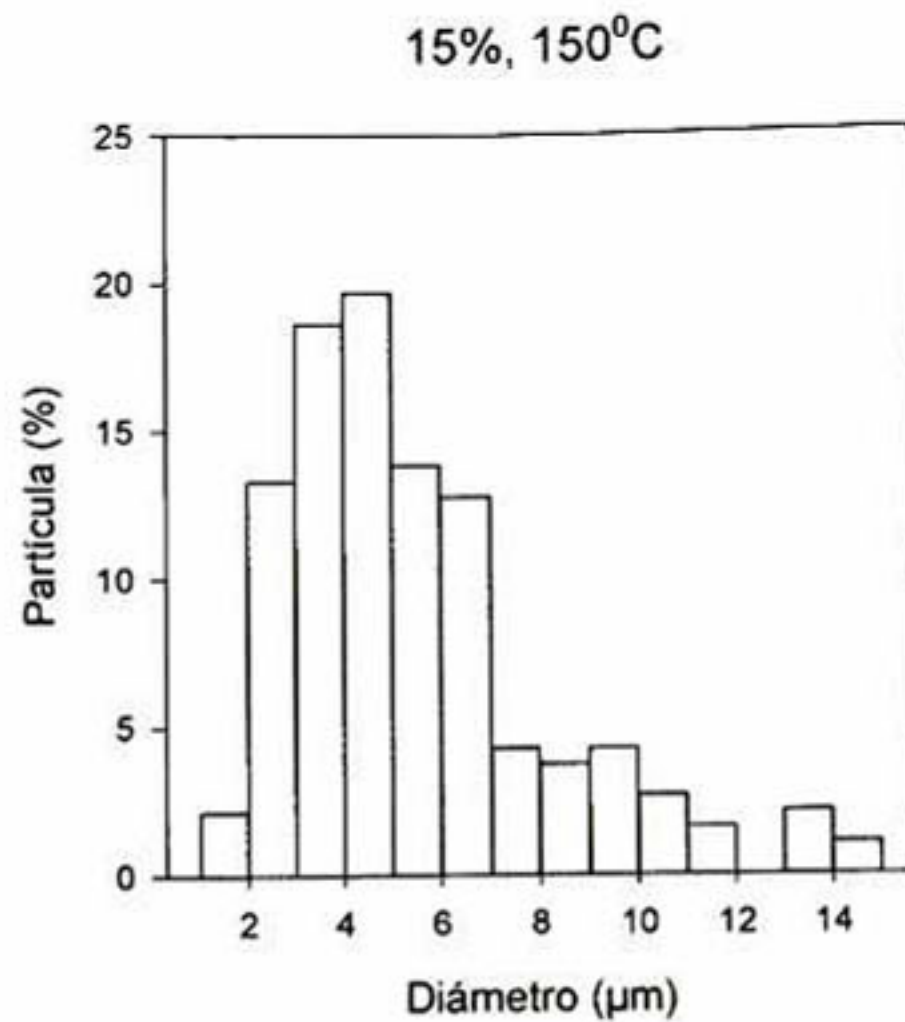
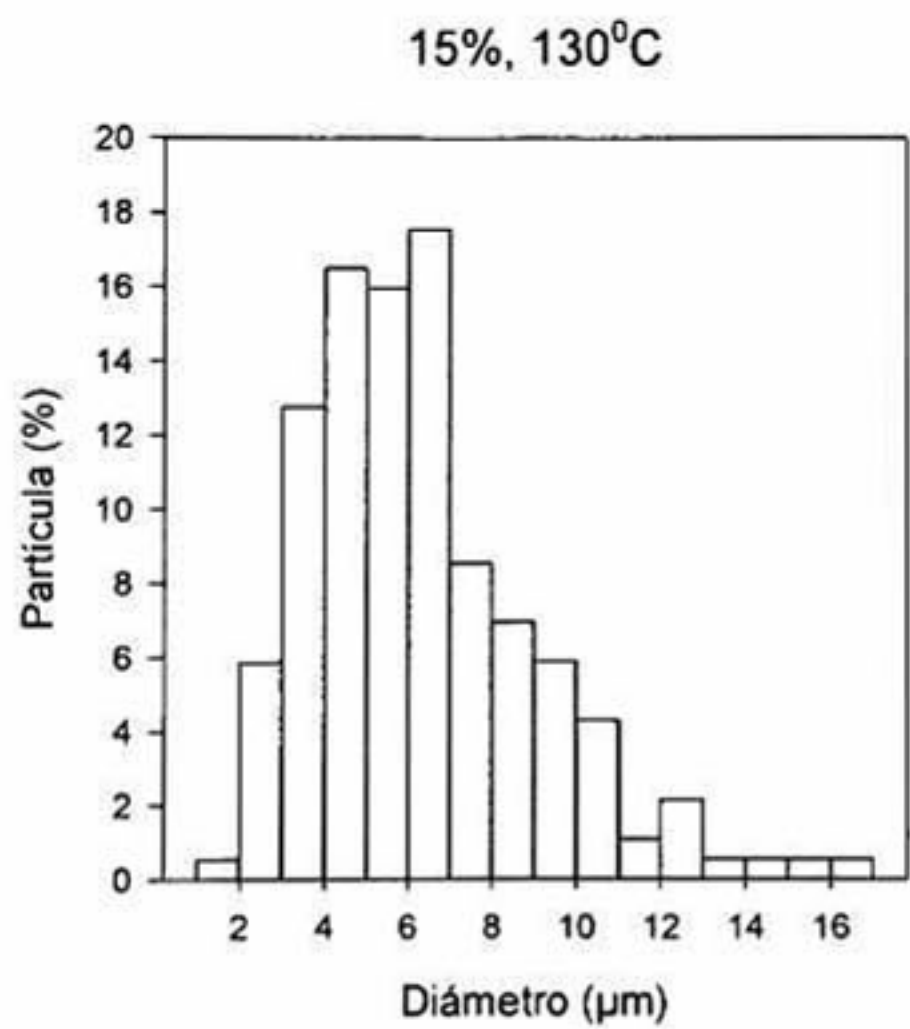


Figura V. 4. Distribución del tamaño de partícula de las microesferas producidas con 15 % de sólidos a 130, 150 y 170 °C.

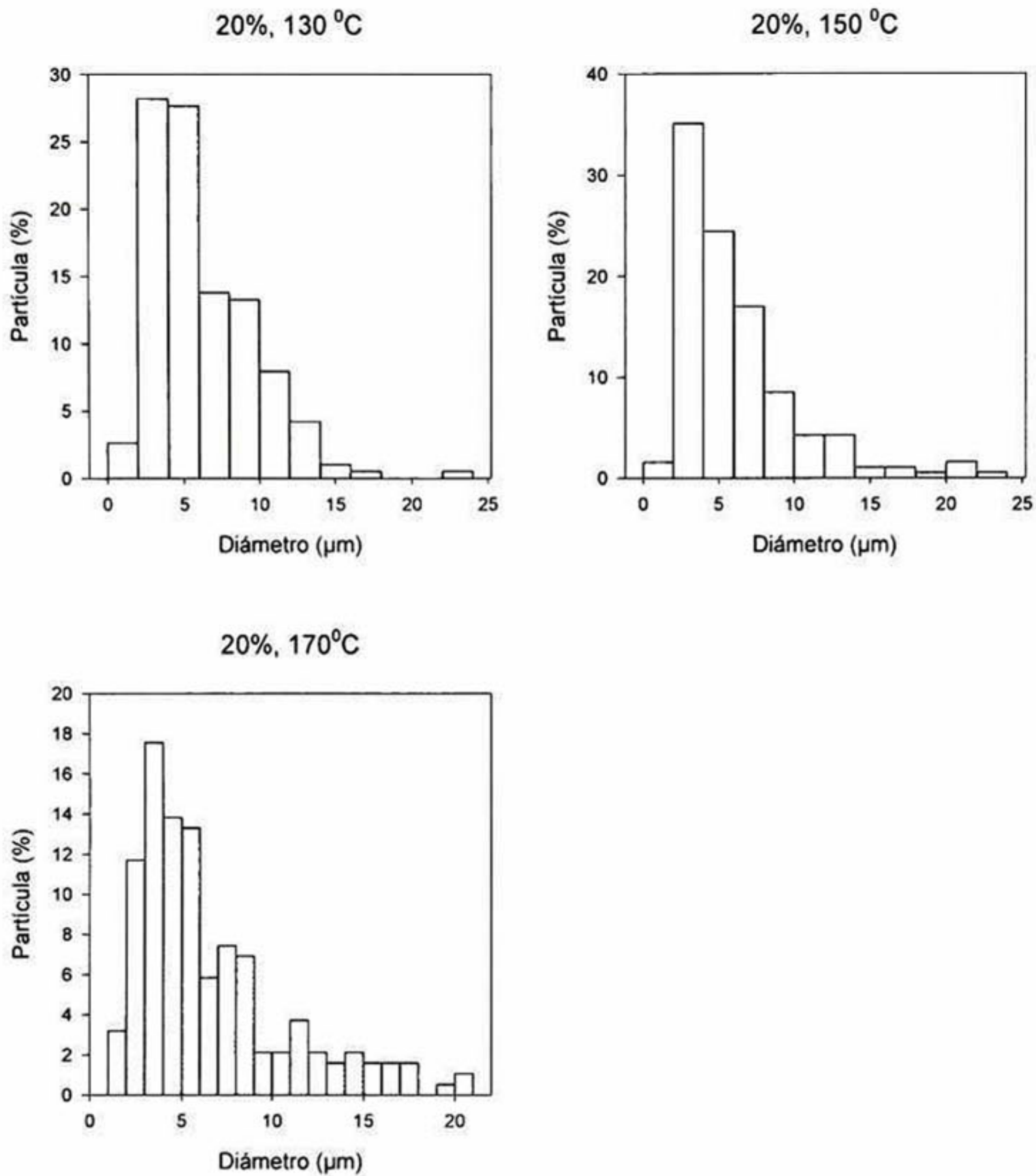


Figura V. 5. Distribución del tamaño de partícula de las microsferas producidas con 20 % de sólidos a 130, 150 y 170 °C. µm

V.4 Conclusiones

- El incremento en la concentración del material de pared influyó positivamente en el rendimiento de la encapsulación.
- El aumento en la temperatura de secado dio lugar a una disminución en la eficiencia de encapsulación..
- El proceso de microencapsulación se optimizó a 20 % de de sólidos totales y a una temperatura de entrada de 170 °C.

V.5 Referencias

- Çam, M., İçyer, N.C., Erdoğan, F., (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredien. for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*. 551, 117-123.
- Da Silva, F.C., da Fonseca, C.R., de Alencar, S.M., Thomazini, M., Balieiro, J.C.d.C., Pittia, P., Favaro-Trindade, C.S., (2013). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food Bioproducts Processing*. 91, 28-36.
- Ferrari, C.C., Germer, S.P.M., Alvim, I.D., Vissotto, F.Z., de Aguirre, J.M., (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science Technology*. 47, 1237-1245.
- Frascareli, E.C., Silva, V.M., Tonon, R.V., Hubinger, M.D., (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food Bioproducts Processing*. 90, 413-424.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design*. 90, 622-632.
- Pang, S.F., Yusoff, M.M., Gimbun, J., (2014). Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Food Hydrocolloids*. 37, 159-165.
- Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P., (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. 114, 616-622.
- Su, Y.L., Fu, Z.Y., Zhang, J.Y., Wang, W.M., Wang, H., Wang, Y.C., Zhang, Q.J., (2008). Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*. 184, 114-121.
- Tonon, R.V., Alexandre, D., Hubinger, M.D., Cunha, R.L., (2009). Steady and dynamic shear rheological properties of açai pulp (*Euterpe oleraceae* Mart.). *Journal of Food Engineering*. 92, 425-431.
- Zobel H. F (1988). Molecules to granule: a comprehensive starch review. *Starch/Starke*, 40: 44-50.

VI. ENCAPSULACIÓN DE ANTOCIANINAS UTILIZANDO ALMIDONES MODIFICADOS

VI.1 Introducción

Existe una amplia variedad de materiales de pared que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios, uno de ellos es el almidón, un polímero de glucosa, formado por dos tipos de moléculas: amilosa, molécula lineal y amilopectina, molécula ramificada. Es un polímero abundante, biodegradable y no tóxico con diversas aplicaciones industriales. Debido a las características que posee tales como de: gelificación, viscosidad y solubilidad ha sido usado como material de pared para encapsular sustancias bioactivas, sin embargo, no posee propiedades emulsificantes y en la actualidad la esterificación de almidones hidrolizados pueden igualar la capacidad encapsulante de la goma arábiga; excelente agente encapsulante. Uno de los almidones más utilizado es el almidón ceroso hidrolizado y esterificado con *n*-OSA que comercialmente se denominan HiCap, Capsul, NLok y se han utilizado principalmente para la encapsulación de sabores y aceites esenciales (Krishnan *et al.*, 2005, Murúa-Pagola *et al.*, 2009, Drusch and Schwarz, 2006). Los grupos acetilo introducidos a las cadenas del almidón, también confieren propiedades emulsificantes y resistencia a la hidratación, se ha utilizado como agente encapsulante para ácido gálico (Robert *et al.*, 2012). Los almidones entrecruzados con epíclorhidrina retardan la liberación de medicamentos (Jiugao and Jie, 1994), el tripolifosfato de sodio es el reactivo más utilizado en el entrecruzamiento de almidones. Existen muy pocos estudios concernientes en el uso de almidones entrecruzados como agentes encapsulantes mediante secado por aspersion. Cai y Corke (2000) encapsularon betacianinas de amaranto y lograron igualar las eficiencias de microencapsulación con maltodextrinas comerciales, sin embargo, no existen estudios en los que se hayan encapsulado antocianinas con almidón fosfatado.

El objetivo del presente trabajo fue encapsular antocianinas de maíz con dos tipos de almidones de maíz modificados, usando tres modificaciones mediante: succinilación, acetilación ó fosfatación. Para evaluar la eficacia de los agentes encapsulantes, se determinó la retención de antocianinas después del secado por aspersión, la eficiencia de encapsulación y su caracterización fisicoquímicas.

VI.2 *Materiales y métodos*

VI.2.1 Microencapsulación

Las microesferas preparadas con los almidones modificados fueron obtenidas mediante el proceso de secado por aspersión en un secador Mini Spray Dryer Lab-Plant SD-05 (Laboratoriums Keison, Co., UK); las microesferas preparadas fueron secadas en un secador por aspersión SD-Basic de LabPlant (Huddersfield, UK). Se prepararon emulsiones con 20 g material de pared, 20 ml del extracto de antocianinas (0.94 mg/mL de cianidina-3-glucósido) y 80 ml de agua destilada. Las mezclas fueron homogeneizadas con un Ultraturrax IKA T-18 Basic a 14000 rpm durante cuatro minutos. La emulsión se mantuvo en agitación constante durante el secado. Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura del aire de entrada de 180 °C y temperatura de aire de salida de 110 °C.

VI.2.2 Caracterización morfológica

La morfología externa e interna de las cápsulas fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido (ESEM EDDAX, GSE detector), con un voltaje de aceleración de 20 kV. La observación de las muestras del estudio de estabilidad se llevo a cabo en un equipo JEOL, JMS-T330 (Tokio, Japón) usando una aceleración de voltaje de 10 kV. Las microesferas fueron fijadas en un porta muestras con una cinta adhesiva de doble cara y cubiertas con un baño de oro en un evaporador Balzers (SCD 050, Baltec Lichtenstein, Austria), a una corriente de 40 mA, tiempo de exposición de 180 segundos, temperatura de 28 °C, con una presión de vacío de 2×10^{-1} mbar). El tamaño de partícula se midió mediante el procesamiento de las imágenes utilizando el software ImageJ, el cual es un programa desarrollado por el National Institute of Health (NIH), USA (Rasband, 2007).

VI.2.3 Color

El color de las microcápsulas se midió utilizando un colorímetro Hunter Lab (MiniScan Hunter Lab, modelo 45 / 0L, Hunter Associates Lab., Ind., EE.UU.), las mediciones de color se expresan en términos de luminosidad L^* ($L^* = 0$ para el negro y $L^* = 100$ para el blanco) y el parámetro a^* [verde (-) a rojo (+)]. Las mediciones se realizaron por triplicado y se realizaron tres lecturas para cada muestra.

VI.2.4 Contenido de humedad

El contenido de humedad de las microesferas fue determinado por diferencia de peso en las muestras antes y después del secado en estufa a 45 °C en presencia de sílica gel durante 24 horas (ó peso constante).

VI.2.5 Actividad de agua

La actividad de agua se puede determinar por la humedad relativa del aire que rodea la muestra cuando el aire y la muestra están en equilibrio. Una vez que ocurra esto, la actividad de agua de la muestra y la humedad relativa del aire son iguales. La medida tomada en el equilibrio se llama humedad relativa en el equilibrio.

Para realizar la medición se utilizó el equipo Aqualab, el cual utiliza un sensor de punto de rocío al medir la temperatura de la muestra y determinar la presión de vapor en el espacio libre. La muestra se equilibra dentro del espacio libre de un compartimiento sellado en donde se determinó en varias ocasiones la temperatura del punto de condensación hasta que alcanza el equilibrio del vapor. Para la calibración del equipo se utilizará un estándar de LiCl 13.4 M con una actividad de agua de 0.25 M y un estándar de NaCl 6 M.

VI.2.6 Solubilidad en agua de las microesferas

Se disolvió un gramo de polvo en 100 mL de agua agitando manualmente a temperatura ambiente durante 30 min (**Figura VI.1.**). Una alícuota de 30 mL se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 mL y fue centrifugado a una velocidad de

430 g durante 15 min. Una alícuota de 10 mL del sobrenadante fue evaporada en un baño y secada en un horno a 110 °C durante la noche.

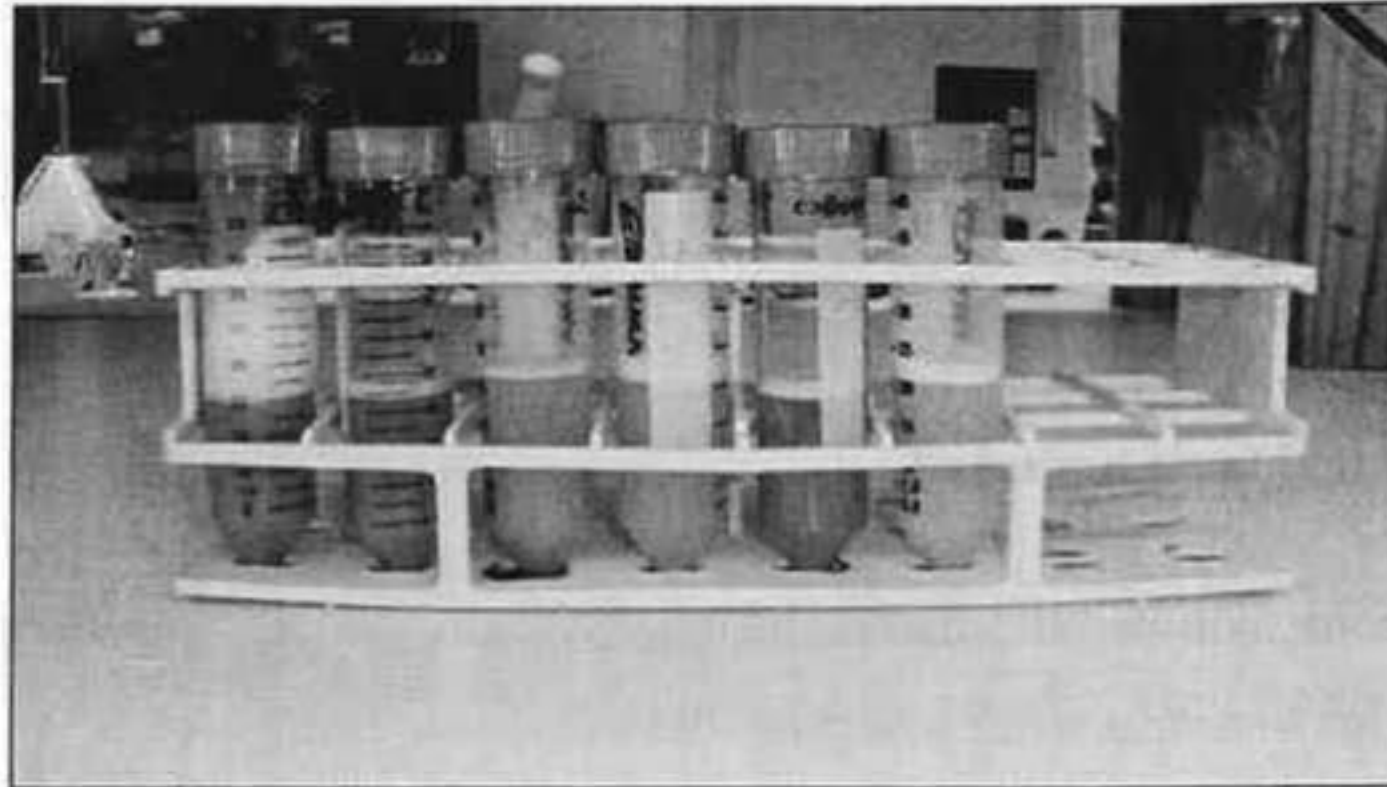


Figura VI. 1. Solubilidad de las microesferas.

VI.2.7 Densidad

Para la determinación de la densidad, 1 g de microesferas fueron transferidas a una probeta volumétrica graduada de 10 mL. El volumen empacado se midió en la probeta después de ser agitado durante 1 min en un vórtex. Se realizó el cálculo dividiendo el peso entre el volumen para obtener las unidades de mg/mL.

VI.2.8 Antocianinas totales encapsuladas

Para cuantificar las antocianinas totales (CAT) en las microesferas se utilizó la metodología descrita por Saenz et al., 2009, que consistió en pesar 500 mg de microesferas a las cuales se les agregó 3 mL de una solución de metanol/ácido acético/ agua (10:1:9). Posteriormente ésta dispersión fue agitada en un vórtex durante 1 min y posteriormente fue sonicada durante 20 min. El procedimiento se repitió hasta obtener un polvo blanco.

En la determinación de antocianinas superficiales, las microesferas fueron tratadas con isopropanol, posteriormente la dispersión se agitó en el vórtex durante 1 min. La

solución se separó mediante centrifugación. La retención de antocianinas y la eficiencia de encapsulación se calcularon de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$RA = \frac{CAT_e}{CAT_t} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Ecuación VI. 1}$$

$$EE = 1 - \frac{SA}{CAT_e} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Ecuación VI. 2}$$

En donde, RA es la recuperación de antocianinas, CAT_e es el contenido de antocianinas totales obtenido experimentalmente, CAT_t es el contenido de antocianinas totales obtenido teóricamente, EE es la eficiencia de encapsulación, SA es el contenido de antocianinas superficiales.

VI.2.9 Contenido de polifenoles totales

La determinación se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi, (1965), que consistió en la elaboración de una curva patrón utilizando ácido gálico como estándar. La cuantificación consistió en tomar 200 μ L del extracto de compuestos fenólicos y se depositar en un tubo de ensayo, posteriormente se agregaran 125 μ L de Folin-Ciocalteu (1N) y se dejó reaccionar durante 6 minutos. Se neutralizó la reacción con 1250 μ L de carbonato de sodio al 19 % y se llevó a un volumen final de 3 mL con agua destilada (1425 mL H_2O). Se agitó en el vórtex y dejó estabilizar la muestra en oscuridad durante 90 minutos. En caso de que la solución se encuentre turbia, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó utilizando el espectrofotómetro midiendo la a 760 nm y la concentración de fenoles se expresará en función del ácido gálico (El blanco se preparó sustituyendo el extracto de fenoles con agua destilada).

VI.2.10 Perfil de antocianinas

El perfil de antocianinas encapsuladas se determinó usando el método descrito en la sección III.2.5.

VI.2.11 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de fourier (FTIR)

Esta técnica se fundamenta en la irradiación de un haz de luz monocromática a materiales orgánicos, éstos (en función de la naturaleza de los enlaces y cargas electrostáticas existentes entre sus átomos y moléculas), absorben una determinada cantidad de energía; este valor puede expresarse por señales en términos de la reflectancia a partir de lo cual se logra un espectro característico de cada material, reflejando su composición química por medio de diferentes vibraciones de las moléculas (Vásquez *et al.*, 2004).

La estructura molecular de los almidones modificados, el extracto de antocianinas y microesferas obtenidas con los almidones nativos y los almidones modificados se caracterizó por análisis de FTIR. El espectro se obtuvo en un equipo Perkin Elmer (Spectrum GX), usando una transformación de 20 barridos con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . El espectro FTIR fue colectado en la región media del espectro infrarrojo que va de 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} .

VI.3 RESULTADOS

VI.3.1 Morfología

La topología de las microesferas afecta la estabilidad, funcionalidad y dispersión de las mismas. La morfología de las microesferas es dependiente de las condiciones de secado y como se observó en el Capítulo V, en donde se obtuvieron partículas más lisas cuando se utilizó el 20 % de sólidos, a una temperatura de entrada de $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una salida de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dichas condiciones se utilizaron para evaluar los almidones succinatados, acetilados y fosfatados, y además compararlos con su contraparte, los almidones sometidos a hidrólisis ácida.

Las microesferas se analizaron mediante microscopía óptica en 3D para asegurarse de que las indentaciones características de las mismas, no son provocadas por el vacío al cual se someten en un microscopio electrónico de barrido convencional. Se observa en la **Figura VI. 2** micrografías tomadas en dos planos a las microesferas elaboradas con almidón de maíz normal succinatado. Como se puede observar, estas siguen presentando indentaciones al no ser sometidas a ningún vacío. Con este estudio se puede comprobar que las indentaciones se atribuyen a la evaporación que ocurre dentro de las microesferas durante el proceso de secado (Nijdam y Langrish, 2006). No se observaron grietas ni poros en la superficie de las partículas. Es deseable que las microesferas sean lisas cuando se encapsula un compuesto sensible a la humedad debido a que se ha reportado que en las indentaciones características se acumula humedad (Liang *et al.*, 2013), provocando así la degradación del bioactivo, además aumenta la superficie de contacto con el medio ambiente y puede propiciar la oxidación de los compuestos encapsulados.

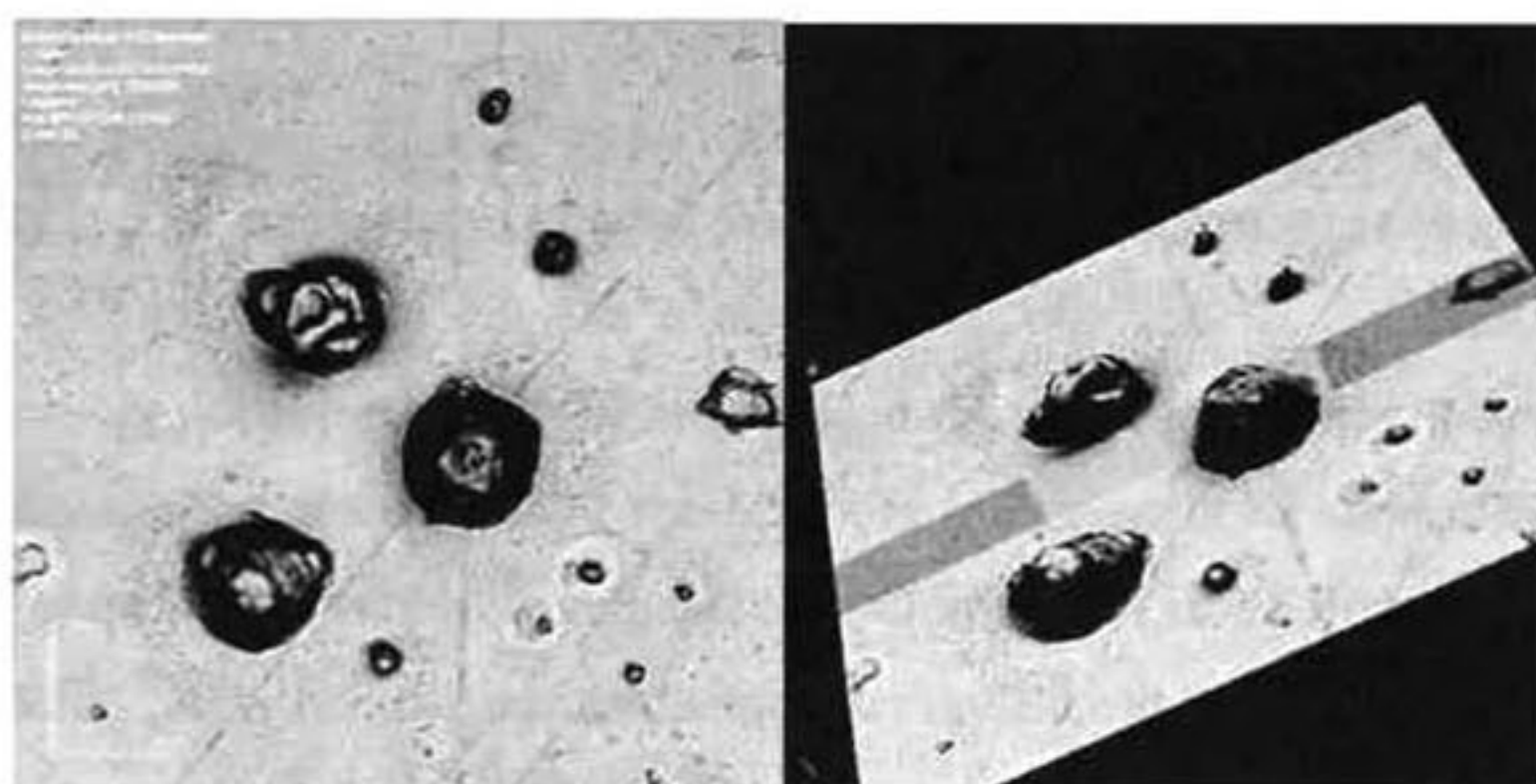


Figura VI. 2. Vista en 3D de microesferas de almidón succinatado.

Las microesferas producidas con almidones esterificados, fueron comparadas con los almidones hidrolizados con ácido clorhídrico. En la **Figura VI. 3**, se muestra la morfología de las microesferas producidas con los almidones hidrolizados, en ellas se muestran en su mayoría partículas con superficies lisas y pocas presentaron indentaciones; éstas mostraron superficies más lisas con relación a las producidas con los almidones succinatados, acetilados y fosfatados (MNS, MWS, MNA, MWA, MNF y MWF). Como se muestra en las **Figuras VI.3-6**, la morfología no se vio afectada en el tipo de esterificación ni el tipo de almidón, sin embargo, sí se ve afectada en el grado de despolimerización de los almidones ya que la viscosidad depende del grado de hidrólisis. Los almidones modificados por extrusión, mostraron una menor viscosidad que los almidones hidrolizados, por lo tanto se forma un spray con gotas más finas y una pared menos densa que facilita la formación de indentaciones. Al observar la morfología interna, las microesferas producidas con los almidones hidrolizados, también mostraron una pared más gruesa con relación a las producidas con almidones esterificados. En la morfología interna también se observó una vacuola, la cual, es producto de la inclusión de aire durante el secado, se mostró un interior hueco en todas las microesferas (ver **Figura VI. 3-6**), y únicamente en las microesferas elaboradas con almidón ceroso succinatado pudo apreciarse una parte no disuelta del extracto de antocianinas en el interior de la microcápsula; por lo que las antocianinas se encontraron dispersas en toda la microcápsula. En general, las microesferas producidas con los diferentes agentes encapsulantes se muestran esféricas con una superficie arrugada (**Figuras VI. 3-4**). La morfología observada es característica de las microesferas producidas mediante secado por aspersión usando almidones modificados. Por ejemplo las obtenidas presentan una morfología similar a la de las microesferas producidas con maltodextrinas (Robert *et al.*, 2010, Tonon *et al.*, 2008).

Las microesferas producidas con los almidones fosfatados fueron difíciles de fracturar, ya que, parecen tener una pared más resistente en comparación con los otros tratamientos. Dicho fenómeno se atribuyó al reforzamiento de la estructura del almidón provocado por el entrecruzamiento con el fósforo, esto se encuentra relacionado con la mayor temperatura de gelatinización observada en los almidones fosfatados.

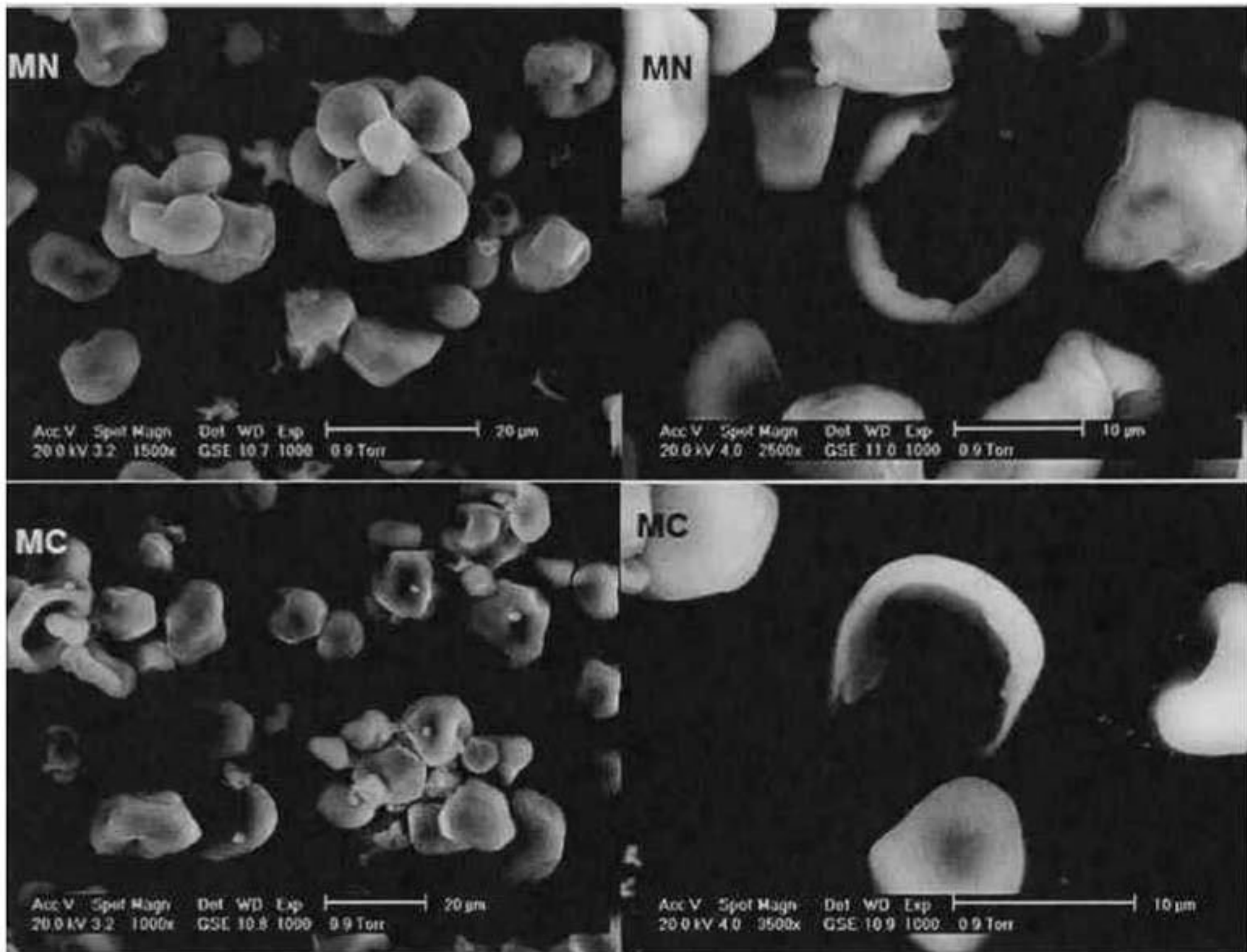


Figura VI. 3. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidones normal y ceroso de maíz. MN: microesferas de almidón normal de maíz hidrolizado; MC: microesferas de almidón ceroso de maíz hidrolizado.

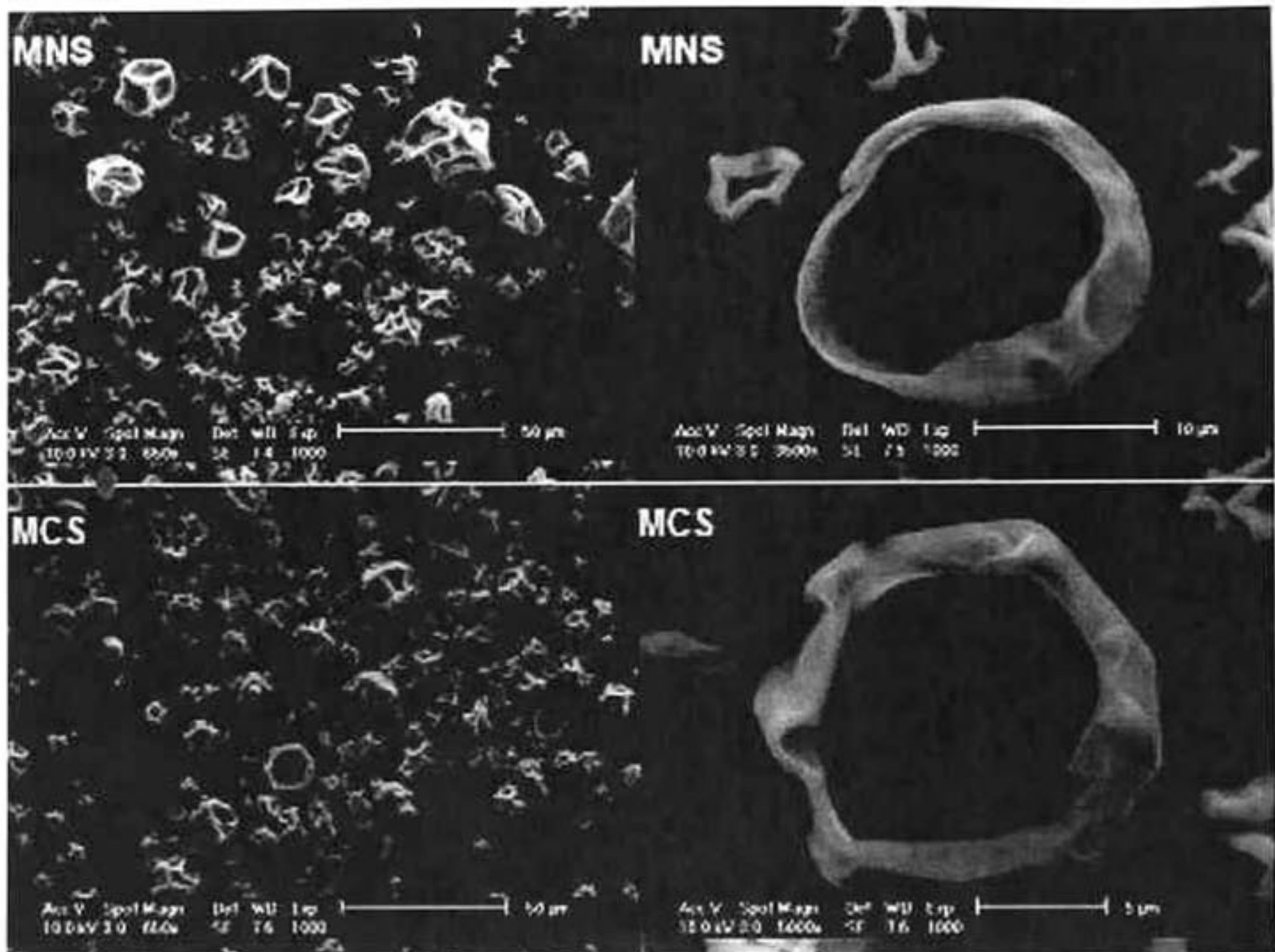


Figura VI. 4. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidón de maíz succinatado. MNS: microesferas de almidón de maíz normal succinatado; MCS: microesferas de almidón ceroso succinatado.

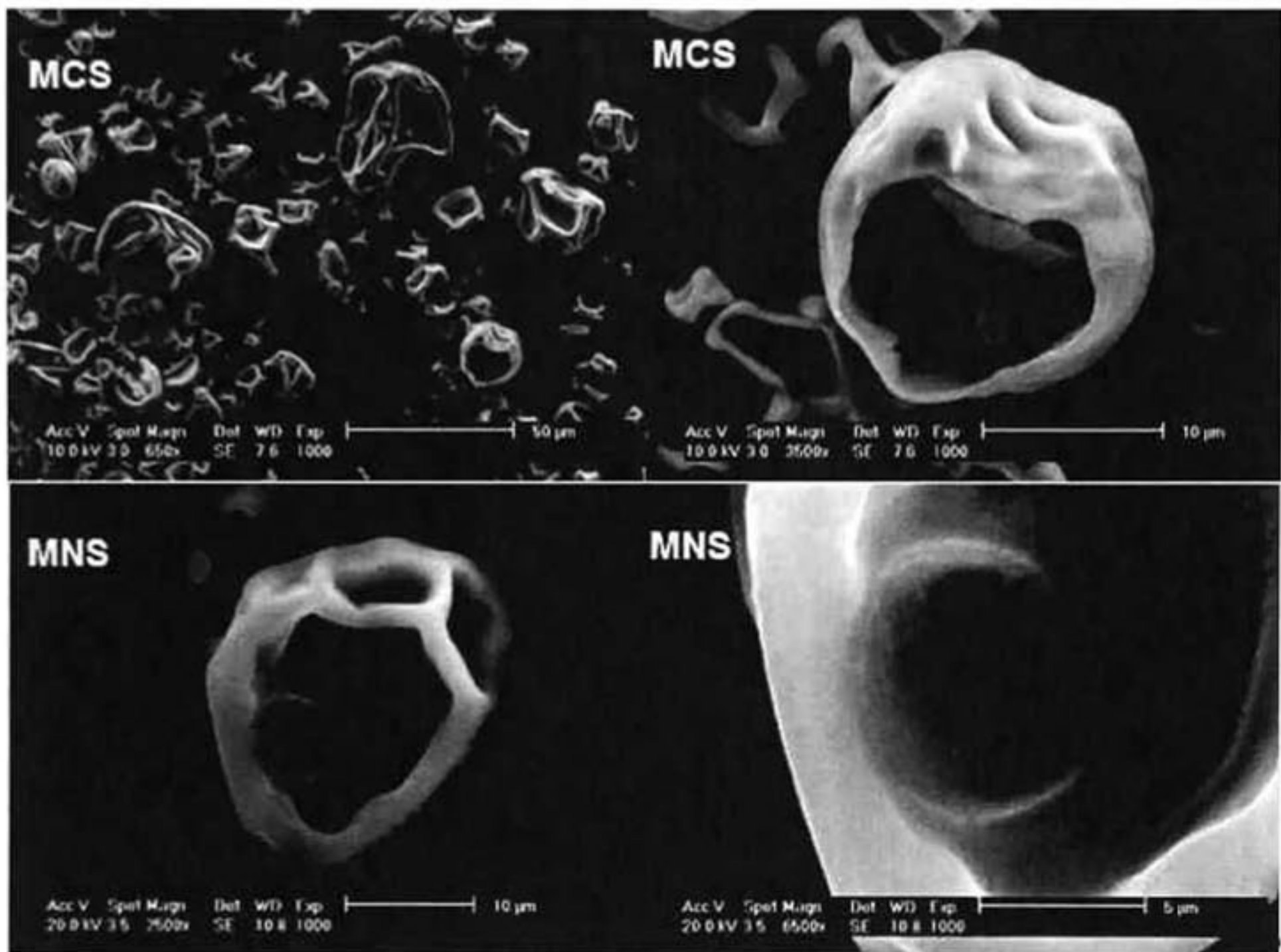


Figura VI. 5. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidón de maíz acetilado. MCS: microesferas de almidón ceroso succinatado de maíz; MNS: microesferas de almidón normal succinatado de maíz.

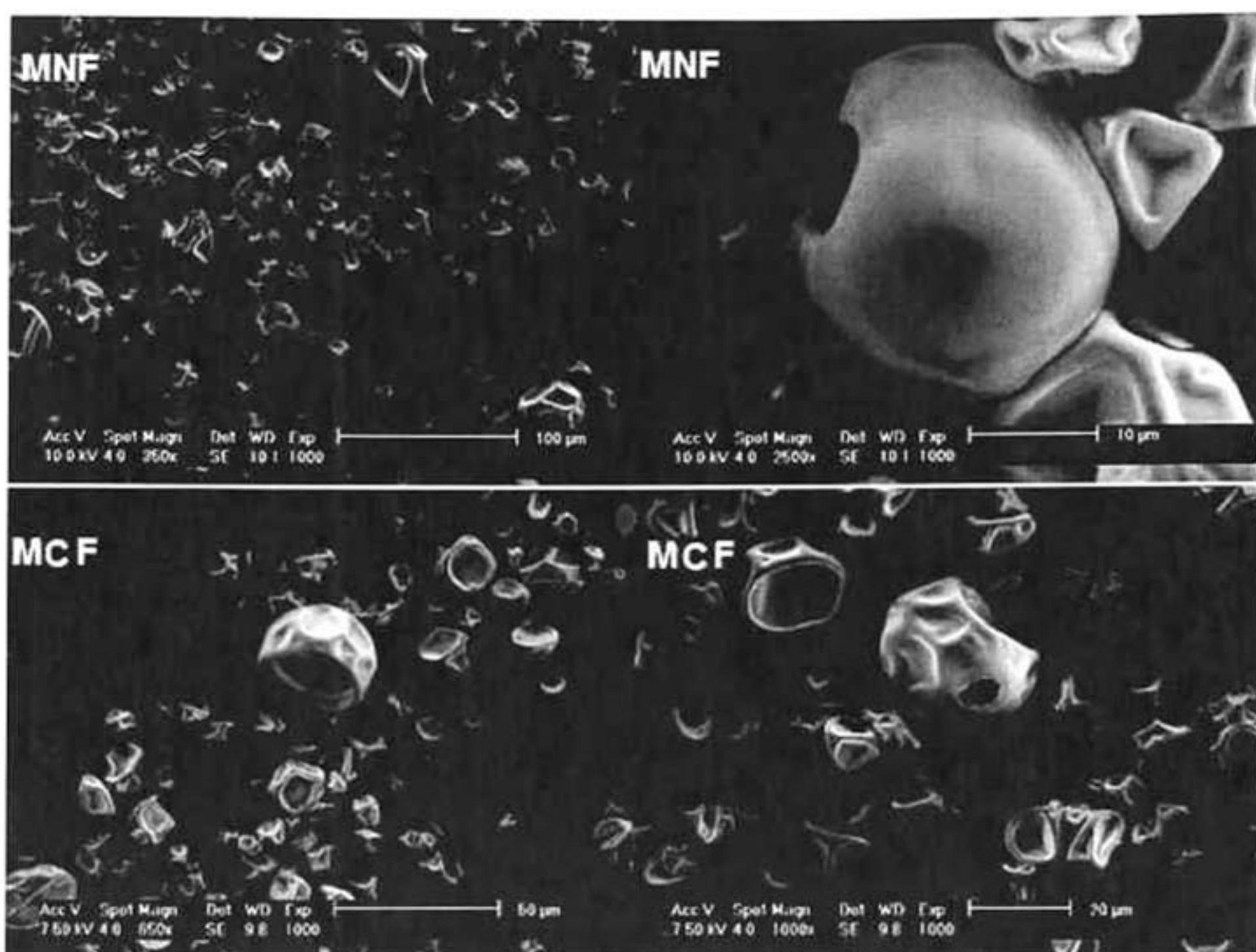


Figura VI. 6. Morfología interna y externa de las microesferas producidas con almidón de maíz fosfatado. MNF: microesferas de almidón de maíz fosfatado; MCF: microesferas de almidón ceroso fosfatado.

VI.3.2 Distribución del tamaño de partícula

La **Figura VI. 7** muestra la distribución del tamaño de partícula de las microesferas producidas con los diferentes tratamientos. La distribución del diámetro de partícula no fue normal, a excepción de las preparadas con almidón normal hidrolizado y esto se debe a que una cantidad considerable de microesferas de menor tamaño se escapan del ciclón durante el secado por aspersion. Los histogramas de frecuencia presentados son de tipo dentado y en el caso de MNA y MCA se observó una distribución bimodal. Se reporta que la distribución bimodal facilita la optimización del volumen ocupado por las microesferas, ya que las partículas pequeñas pueden ocupar los espacios huecos (Ferrari *et al.*, 2012).

Se observó que de un 80 a 90 % de las microesferas producidas con los almidones esterificados (MNS, MWS, MNA, MWA, M.NF y MWF) presentaron diámetros menores a 11 μm , en cambio un 50 % de las microesferas producidas con los almidones hidrolizados fue menor a 11 μm .

Las microesferas producidas con todos los tratamientos mostraron una distribución de tamaño de partícula de entre 2 μm a 35 μm (**Figura VI. 7**). Los diámetros observados en las microesferas producidas con los almidones hidrolizados fueron más grandes que las producidas con los almidones esterificados (**Cuadro VI. 1**). Cabe señalar que el proceso de extrusión provoca la fragmentación de los gránulos de almidón y se atribuye el tamaño de las microesferas al tamaño molecular del agente encapsulante (Tonon *et al.*, 2010).

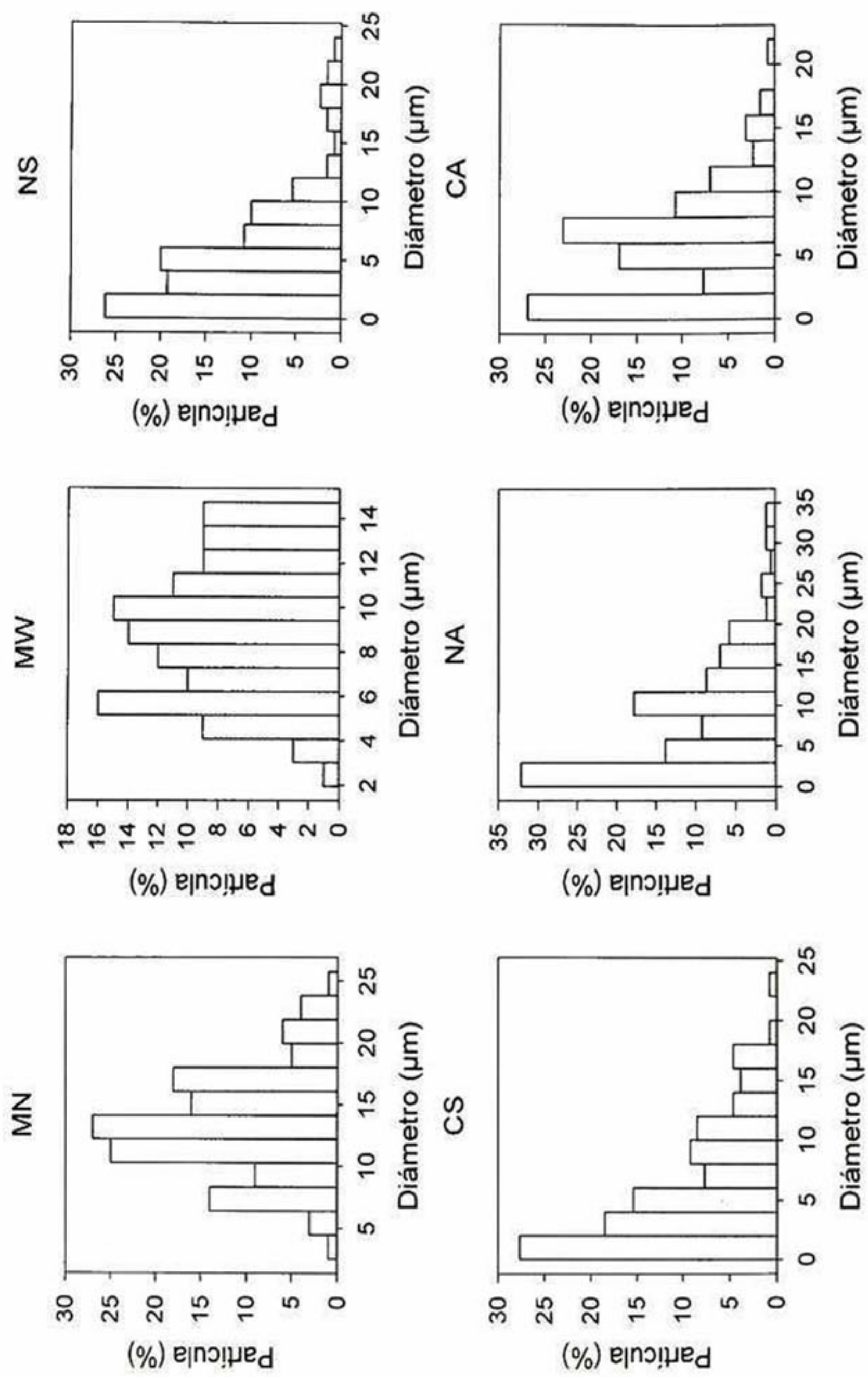


Figura VI. 7. Distribución del tamaño de las microesferas.

Cuadro VI. 1. Características fisicoquímicas de las microesferas.

Análisis	MN	MC	MNS	MCS	MNA	MCA	MNF	MCF
Diámetro	12.62±4.38	8.99±3.39	5.02± 4.84	5.60±5.1	6.90±7.81	5.21±4.21	3.46±5.21	5.94±6.64
Densidad	0.54±0.01	0.49±0.01	0.27±0.01	0.21±0.01	0.29±0.01	0.25±0.01	0.20±0.01	0.23±0.01
Higroscopicidad	8.67	10.00	15.26	17.01	15.62	16.03	24.56	25.53
Solubilidad	11.57	18.12	33.46	96.04	25.13	97.01	80.00	67.51
%H	2.94±0.01	3.10±0.06	4.34±0.03	4.62±0.03	2.44± 0.02	3.94±0.07	4.41±0.10	4.53±0.05
Aw	0.17±0.00	0.17±0.00	0.19±0.00	0.26±0.00	0.25±0.00	0.19±0.00	0.23±0.00	0.30±0.00
a	14.87±0.04	15.29±0.03	25.90±0.21	25.55±0.21	29.16±0.02	25.51±0.13	26.78±0.00	26.61±0.02
b	-2.19±0.05	-1.62±0.00	0.46±0.06	0.21±0.02	1.44±0.05	-0.44±0.04	0.06±0.00	0.29±0.05
C	15.38±0.00	15.03±0.00	25.9±0.21	22.94±0.01	29.20±0.01	25.51±0.13	26.78±0.00	26.61±0.02

MN: microesferas de almidón normal hidrolizado; MC: microesferas de almidón ceroso hidrolizado; MNS: microesferas de almidón succinatado; MNC: microesferas de almidón ceroso succinatado; MNA: microesferas de almidón normal acetilado; MCA: microesferas de almidón ceroso succinatado; MNF: microesferas de almidón normal fosfatado; MCF: microesferas de almidón ceroso fosfatado. Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

VI.3.3 Densidad

El **Cuadro VI. 1** muestra la densidad aparente de las microesferas preparadas con los diferentes almidones. La densidad aparente de los polvos secados por aspersión es muy compleja ya que depende de múltiples factores, entre ellos la inflación y el arrugamiento durante el secado por pulverización. Factores tales como la viscosidad y el comportamiento de transición vítrea pueden influir en tales fenómenos. Esto puede depender indirectamente en el peso molecular y por esta razón ésta técnica puede ser imprecisa, sin embargo se puede obtener un valor aproximado.

Las microesferas producidas con almidones hidrolizados presentaron valores similares a 0.48 g/cm^3 , valor reportado para antocianinas microencapsulados de açaí utilizando almidón de tapioca (Tonon *et al.*, 2010). Las microesferas producidas con MNS, MWS, MNA, MWA, MNF y MNW presentaron valores de entre 0.21 g/cm^3 a 0.29 g/cm^3 ; estos valores fueron inferiores a los correspondientes a sus contrapartes los almidones hidrolizados. Esto es debido a que los almidones nativos tienen mayor peso molecular en comparación con los almidones modificados (Tonon *et al.*, 2010). Las microesferas más pesadas se acomodan fácilmente, ocupando menos espacio y produciendo una mayor densidad de bulto (Peng *et al.*, 2013). La densidad es más alta en MN y MW, lo cual, está en concordancia con el mayor tamaño de partícula en los almidones hidrolizados (**Cuadro VI. 1**). MNS y MNA presentaron una densidad aparente mayor en comparación con MWS y la MWA. Estos resultados sugieren que los almidones esterificados y extrudidos tienen un menor peso molecular en comparación con los almidones modificados.

VI.3.4 Contenido de humedad, actividad de agua (a_w) e higroscopicidad

En el **Cuadro VI.1**, se encuentran los análisis de actividad de agua (a_w), humedad y parámetros de color L, a y b. La humedad es un factor crítico para la preservación de la calidad de las microesferas de antocianinas. Después del secado por aspersión, las microesferas fueron inmediatamente colocadas en el desecador para su enfriamiento. Se obtuvieron actividades de agua de entre 0.19 y 0.30; las humedades se encontraron entre 2.4 y 4.53 %.

La coloración obtenida en los polvos fue rosa; la luminosidad se encontró entre 68 y 72. El valor de “a” fue positivo por lo que se encuentra en el rojo, y valor negativo de “b” correspondió a una coloración azul.

La humedad de los almidones hidrolizados y los almidones esterificados, estuvo entre 2.44 % y 4.62 %, siendo el almidón acetilado normal el que presentó el menor valor y el ceroso succinatado el que presentó el mayor valor. Los valores de a_w estuvieron entre 0.19 % y 0.26 %, lo cual es un factor positivo para la estabilidad de los pigmentos en las microesferas, ya que, la actividad de agua representa el agua disponible para las reacciones bioquímicas y entre menor sea implica una mayor estabilidad (Tonon *et al.*, 2009). Los valores de humedad y actividad de agua dependen de la temperatura de secado durante el procesamiento, a temperaturas altas se obtiene una más baja humedad (Fazaeli *et al.*, 2012), se recomiendan no trabajar a temperaturas mayores a 180 °C, esto es debido a que los pigmentos se pueden degradar en mayor medida (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011).

Dado que las microesferas son materiales higroscópicos, la higroscopicidad fue también determinada. Como se muestra en el Cuadro VI.1, la higroscopicidad estuvo entre 15.26 g/100g y 25.53 g/100g. Estos valores son mayores que los reportados para microesferas elaboradas con maltodextrinas (13.62 g/100g) secadas a condiciones similares, a 170 °C a la entrada y 94 °C a la salida (Tonon *et al.*, 2008). Los valores obtenidos en las microesferas elaboradas con almidones fosfatados son menores a los obtenidos por (Cai y Corke, 2000) quienes reportaron un valor de 28.30 g/100g en microesferas de betalainas de amaranto preparadas con almidón ceroso fosfatado.

VI.3.5 Contenido de Antocianinas y Polifenoles en microesferas

Se presentan en el **Cuadro VI. 2**, los resultados obtenidos en la retención de antocianinas (RA) y polifenoles (RP), también como la eficiencia de encapsulación que se obtuvo para ambos (EE_A y EE_P) en la producción de microesferas mediante secado por aspersión. Para poder observar el efecto de las modificaciones se compararon los almidones succinatados, acetilados y fosfatados con su contraparte, los almidones hidrolizados. Cabe señalar que se intentó utilizar a los almidones nativos como agentes encapsulantes, sin embargo, son difíciles de dispersar y gelifican en el atomizador provocando un taponamiento; por ello no se evaluaron.

La retención de antocianinas ó de polifenoles, se refiere al porcentaje de compuestos recuperados después del secado por aspersion, puesto que son lábiles a la temperatura. Se observa en el **Cuadro VI. 2**, una mayor RA, RP, en las microesferas producidas con los almidones esterificados en comparación con su contraparte, los almidones hidrolizados. Esto se atribuye a la mayor solubilidad de los almidones esterificados e hidrolizados por extrusión que ayudaron a la incorporación de los compuestos (Cai and Corke, 2000).

Los valores de RA obtenidos para MNS, MCS, MNA y MCA, fueron mayores que los reportados para las mezclas de CapsulTM y maltodextrinas, en donde Silva et al., (2013) reportaron un valor de RA = 80.11 % en microesferas de extracto de *Myrciaria Jaboticaba* secadas a temperaturas de 180 y 79 °C, de entrada y salida. Los más altos valores de RA y RP se observaron en las microesferas producidas con el almidón normal succinatado.

La retención de polifenoles fue mayor en las microesferas producidas con el almidón de maíz succinatado. En los almidones hidrolizados (RP), fue similar a la reportada por Robert et al., (Robert *et al.*, 2012) quienes reportaron una recuperación de 54.9 % usando almidón nativo de papa. Dichos autores también utilizaron almidón acetilado de papa con un GS de 0.096, como agente encapsulate y obtuvieron un 65.4 % de retención de polifenoles, valor menor al obtenido en el almidón normal de maíz acetilado (79.19 %)

La eficiencia de encapsulación se refiere al porcentaje de antocianinas que se encuentra dentro de la microesfera, tomando en cuenta el total de los compuestos en las microesferas. Generalmente éste valor es alto, ya que no se toman en cuenta las antocianinas que se degradaron durante el secado por aspersion. El EE_A obtenido para las microesferas producidas con los almidones esterificados estuvieron entre 95.64 y 97.22 %, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), y los valores fueron ligeramente menores al reportado por Idham et al., (2010) que reportaron 98.4 % utilizando goma arábica y 96.7 % en almidón soluble en la encapsulación de antocianinas de jamaica.

La eficiencia de encapsulación de los polifenoles también fue más alta en los almidones esterificados. Robert *et al.*, (2010), obtuvieron valores ligeramente mayores utilizando maltodextrinas como agente encapsulante reportaron 102 % de RA y 99 % de RP. Cabe señalar que de acuerdo a Cao *et al.*, (2009), se puede sobreestimar la cantidad de cianidina-3-glucósido cuando se cuantifica por espectrofotometría, lo cual se debe a la degradación de antocianinas aciladas, incrementándose de esta forma la cantidad de cianidina-3-glucósido. Por ésta razón es posible obtener valores ligeramente mayores al 100 % de recuperación.

Cuadro VI. 2. Recuperación de antocianinas ó polifenoles y eficiencia de encapsulación del proceso de secado por aspersión.

Material	Recuperación de		Retencion de	
	antocianinas	%EE	polifenoles	%EE
MNS	93.91±6.88	96.91±0.29 ^a	93.89±8.06	97.36±0.01 ^a
MCS	90.25±1.74	96.17± 0.27 ^a	61.55±2.22	96.54±0.05 ^b
MNA	90.88±6.03	97.16±0.30 ^a	79.19±18.03	97.51±0.10 ^{ac}
MCA	88.94±1.71	97.22±0.29 ^a	48.93±0.16	97.68±0.02 ^c
MNF	69.79±2.92	96.25±0.02 ^a	73.75±5.66	96.25±0.02 ^d
MCF	70.81±6.40	95.64±0.09 ^a	76.41±14.77	95.64±0.09 ^e
MN	54.88± 5.21	79.16±0.35 ^b	48.99±12.52	80.59± 0.11 ^f
MC	49.85±4.82	77.28±0.39 ^b	55.4±16.35	87.73±0.08 ^g

MNS: microesferas de almidón succinatado; MCS: microesferas de almidón ceroso succinatado; MNA: microesferas de almidón normal acetilado; MCA: microesferas de almidón ceroso succinatado; MNF: microesferas de almidón normal fosfatado; MCF: microesferas de almidón ceroso fosfatado; MN: microesferas de almidón normal hidrolizado; MC: microesferas de almidón ceroso hidrolizado.¹Media aritmética de tres repeticiones ± error estándar. Letras iguales dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

VI.3.6 Perfil de antocianinas después del secado por aspersión

La identificación de la antocianinas encapsuladas se realizó mediante HPLC para observar los cambios sufridos de éstas después del secado por aspersión. Como se puede observar en el **Cuadro VI.3**, en donde se compara el perfil de antocianinas del extracto de maíz con el extracto de las microesferas. La proporción de antocianinas disminuyó ligeramente después del secado por aspersión en los almidones modificados. La pérdida de antocianinas se atribuye al tratamiento térmico sufrido durante el secado por aspersión. Debido a la baja concentración de los picos 2, 7 y 13 en el extracto, estos no fueron detectados en el extracto de las microesferas con excepción de NF, en donde el pico 2 sí es detectable. El porcentaje de pérdida de cada antocianina en los diferentes tratamientos es muy similar en MNS, MCS, MNA y MCA, sin embargo, son diferentes en el perfil de los almidones fosfatados (MNF y MWF).

Las microesferas elaboradas con los almidones fosfatados presentaron la menor retención de antocianinas y por lo tanto era de esperarse una mayor susceptibilidad en la degradación de las antocianinas más lábiles y un aumento en las antocianinas de tipo acilado. Es decir, es de esperarse que cianidina-3-glucosido se degrade en mayor medida, debido a que se reporta que suele ser menos estable que la pelargonidina-3-glucosido y la peonidina-3-glucosido (Xu y Chang, 2008), sin embargo hay un aumento en la proporción de cianidina-3-glucosido en MNF y MWF. Esto se debe a la mayor susceptibilidad de la misma, ya que; de esta manera se incrementó la proporción de antocianinas de tipo acilado como la Cianidina-3-(6''malonil glucosido) y la peonidina-3-malonilglucosido en todos los tratamientos con excepción de MWF.

Fang y Bhandari (2011) reportaron también ligeros cambios después del secado por aspersión de polifenoles de arrayán con maltodextrinas (DE 10), sin embargo, después de 6 meses de almacenamiento, cada compuesto detectado disminuyó en diferente medida. Estos autores reportaron que no fue posible detectar la antocianinas cianidina-3-glucósido, aunque sí detectaron compuestos fenólicos como el ácido gálico.

Cuadro VI. 3. Perfil de antocianinas en el extracto de las microesferas preparadas

Pico	Rt ¹	Identificación	E	NS	CS	NA	CA	NF	CF
1	9.7	Cianidina-3-glucosido	25.14	24.27	22.66	25.68	25.10	28.04	26.94
2	10.2	?	0.40	N.D.					0.43
3	10.5	Cianidina-3-rutinosido	1.37	1.3	0.70	1.18	0.92	1.35	0.68
4	10.8	Pelargonidina-3-glucosido	2.45	3.01	2.15	2.65	2.29	1.90	1.60
5A	11.1	Cianidina-3-malonylglucosido	8.79	7.67	7.63	7.61	7.38	6.73	7.02
6	11.5	Peonidina-3-glucosido	6.68	6.76	5.58	6.26	6.13	5.91	7.29
7	11.9	?	0.31	N.D.					0.38
8A	12.4	Cianidina-3-(6"malonil glucosido)	27.25	30.65	31.71	31.04	32.21	35.08	29.63
9	12.9	peonidina-3-malonylglucosido	2.21	1.35	0.81	0.87	1.05	0.89	0.86
10	13.3	Peonidina-3-(6" malonylglucosido)	2.43	3.31	3.58	3.00	3.24	2.23	2.86
11	13.7	?	9.97	11.5	13.80	11.25	11.65	8.43	10.86
12	14.0	peonidina-3-(6"malonylglucosido)	7.75	7.50	8.15	7.63	7.40	8.10	8.71
13	14.6	?	0.52	N.D.					
14	15.0	Pelargonidina-3-(dimaloni-glucósido)	1.63	0.71	0.84	0.85	0.68	0.38	0.66
15	15.2	Peonidina-3-(dimaloni-glucósido)	3.09	2.00	2.42	2.00	1.95	1.02	2.10

Rt: tiempo de retención. ND: No detectado.

VI.3.7 FTIR

En la **Figura V1.8** se muestran los espectros de transmitancia de los almidones nativos y modificados. En la **Figura V1.9** se muestran los espectros de las microesferas producidas con los almidones nativos y modificados, en el intervalo de número de onda de 4,000-500 cm^{-1} .

En el cuadro **Cuadro VI.4**, se muestran las bandas asignadas a cada tratamiento. No se presentan los espectros realizados a los almidones fosfatados, ya que mediante FTIR no se apreciaron cambios, tampoco se presentan los espectros de las microesferas de maíz ceroso por ser muy similares a los del almidón normal. En los espectros se muestran las absorbancias características del almidón (**Figura V1.8**), en el caso de los almidones succinatados se confirmó la sustitución de grupos hidroxilo por grupos carbonilo del *n*-OSA mediante la aparición de un nuevo pico en el espectro a 1722 cm^{-1} que se atribuye a la formación de grupos éster de los grupos carbonilo y apareció otro pico a 1570 cm^{-1} que se asignó a la vibración de tensión asimétrica del anión carboxilato. En los almidones acetilados se observó la aparición de un nuevo pico a 1730 cm^{-1} atribuido también al grupo carbonilo (Xu *et al.*, 2004).

En el extracto de antocianinas (**Figura V1.9**), se observa una banda a 1710 cm^{-1} que se debe a la banda de estiramiento de C=O de grupos aldehído/cetona de los anillos glucosídicos, la banda a 1575 cm^{-1} corresponde al estiramiento del doble enlace (C=C) (Nakanishi and Solomon, 1977). Específicamente las de 1640-1630 cm^{-1} , corresponden al estiramiento del doble enlace C=C del anillo de benceno presente en las antocianinas. La banda a 1200 cm^{-1} de fuerte intensidad corresponde al estiramiento C-OH de los compuestos fenólicos, la cual está acoplada con modos OH a 1209 cm^{-1} . En las microesferas producidas con los almidones nativos, aparece un hombro a 1720 que se atribuye al estiramiento del grupo carbonilo C=O de ácidos carboxílicos protonados, que no aparece en el almidón de maíz, por lo cual fue asignada a los ácidos carboxílicos presentes en las antocianinas. En el caso de las microesferas elaboradas con los almidones acetilados no se logra apreciar diferencia alguna con el espectro del almidón acetilado, es decir no se observó la formación de algún nuevo enlace. En la microcápsula de almidón de maíz succinatado se observa una señal a 1711 cm^{-1} , un hombro a 1645 cm^{-1} , una señal a 1560 cm^{-1} que puede

deberse al extracto de antocianinas puesto que también se observa un pico a la misma longitud y un hombro a 1655 cm^{-1} que también se observa en el almidón succinatado. Con lo anterior se observa que únicamente existen interacciones de puentes de hidrógeno entre las antocianinas y los almidones modificados.

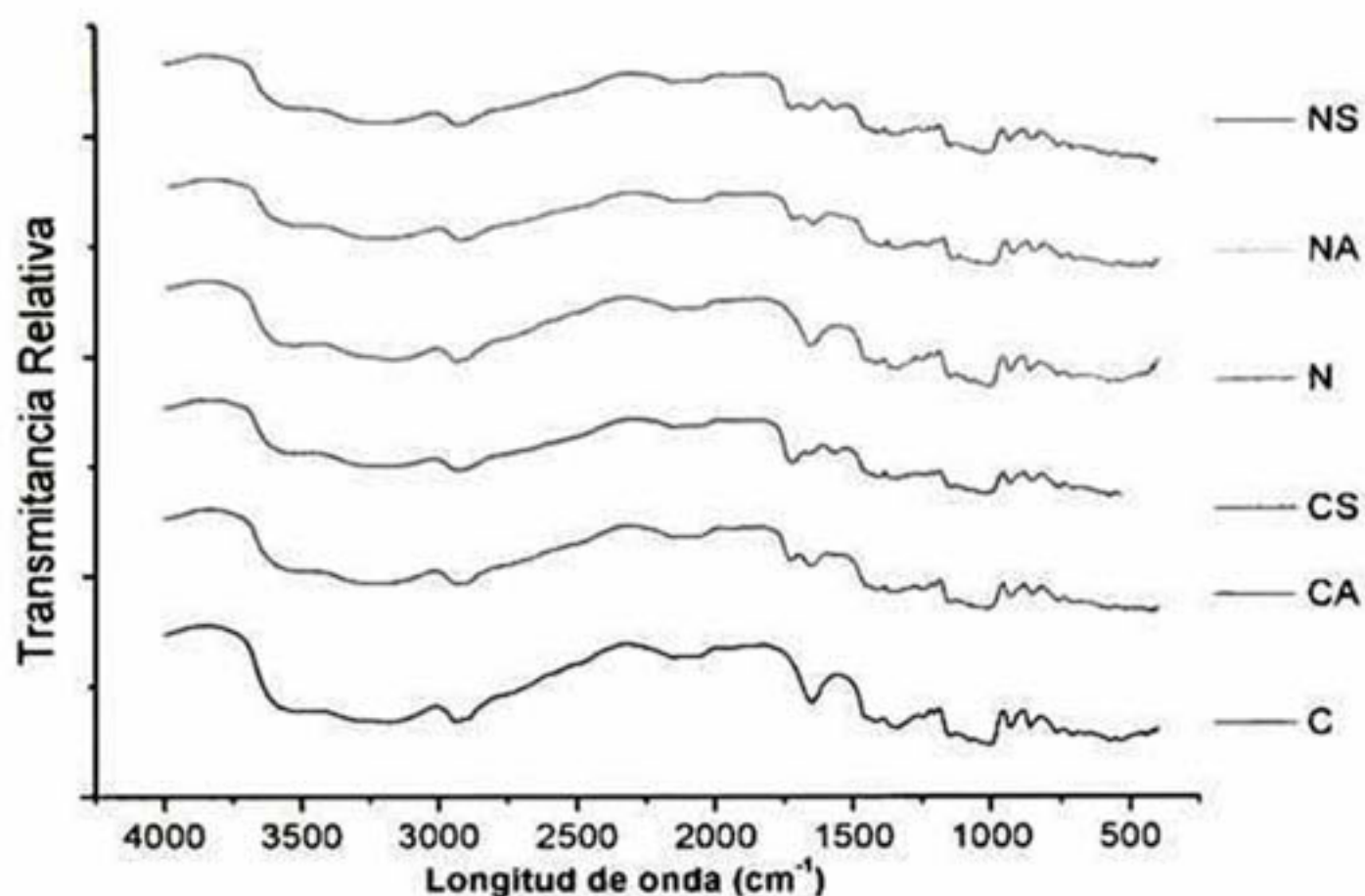


Figura VI. 8. Espectro FTIR del almidón ceroso de maíz (C), del maíz ceroso acetilado (CA), del maíz ceroso succinatado (CS), del almidón normal de maíz (N), del maíz acetilado (NA), del maíz succinatado (NS).

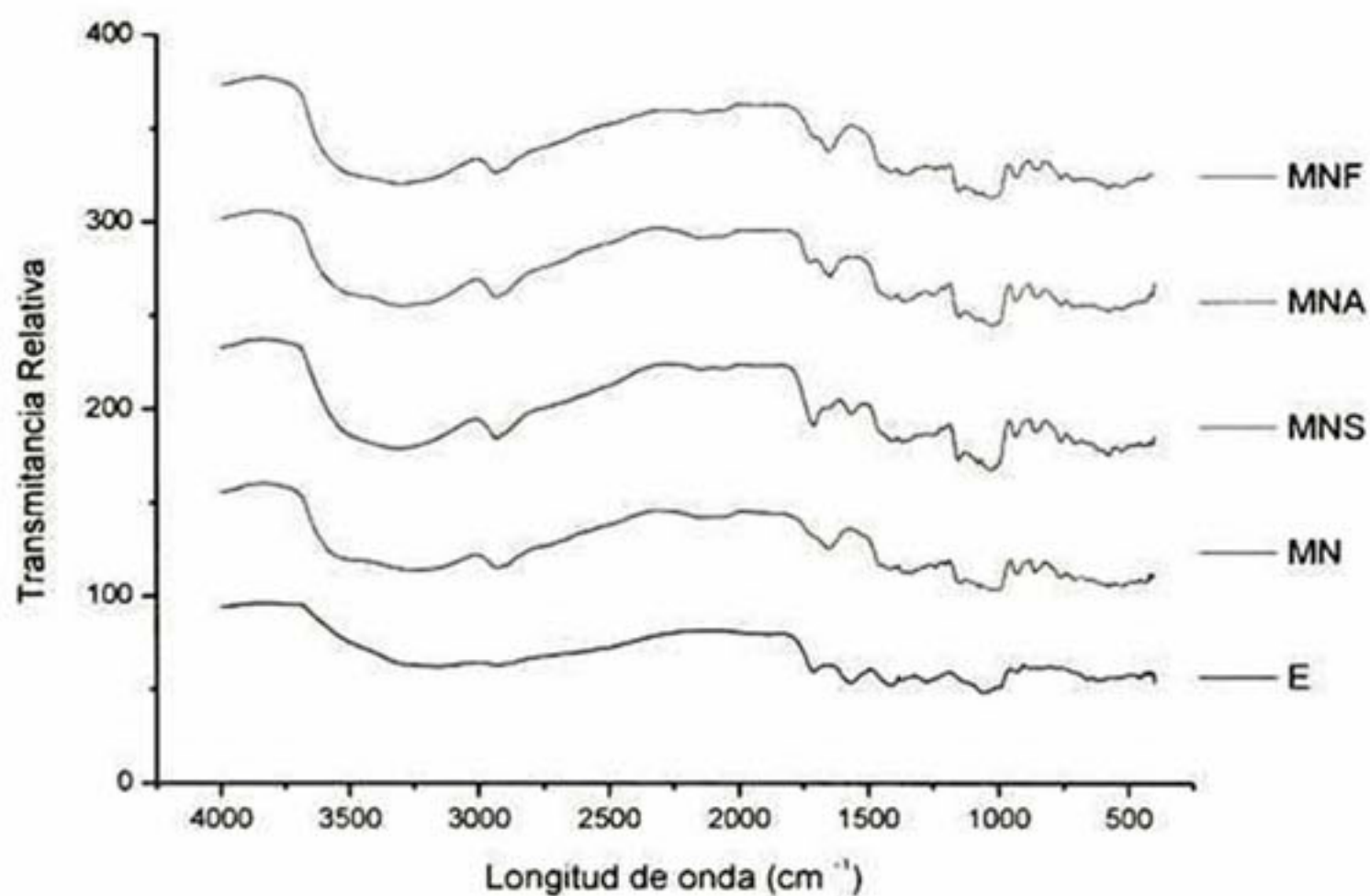


Figura VI. 9. Espectro FTIR del extracto de antocianinas (E), de las microsferas preparadas con: almidón normal de maíz (MN), almidón normal succinilidao (MNS), almidón almidón normal acetilado (MNA) y almidón normal fosfatado (MNF).

Cuadro VI. 4. Bandas de de absorción FTIR asignadas.

N y C	NS y CS	NA, CA	E	MNS y MCS	MNA, MCA, MNF.	Asignación de la banda
3733-3000	3685-3012	3706-3000		3693-3000	3700-3000	O-H modos de estiramiento, estiramientos vibracionales asociados con conexión, entre otras y intramoleculares
2923-1350	2932 1722	2930 1730	1713 1567	2930	2932	enlazando grupos hidroxilo (Fang <i>et al.</i> , 2004) C ₁₂ deformacion (Fang <i>et al.</i> , 2004) C = O grupo carbonil (Fang <i>et al.</i> , 2004)
1650	1656	1656		1653	1650	Agua absorbida en las regiones amorfas del almidón (Fazaeli <i>et al.</i> , 2012, Fang <i>et al.</i> , 2004) RCOO- anión carboxilato (Nagaoka <i>et al.</i> , 2005)
1460	1459	1455		1454	1455	CH ₂ flexión
1420	1412	1414	1414	1414	1414	CH ₂ torsión, C-O-H flexión
1242	1240	1239		1239	1240	CH ₂ OH (cadena terminal) modo relacionado
1150	1152	1150		1153	1152	C-O, C-C estiramiento
1080	1079	1080		1080	1079	C-O-H flexión del anillo de la anhidroglucosa (Fang <i>et al.</i> , 2004, Chang <i>et al.</i> , 2011)
931	934	931	1051	933	934	Modo esqueletal del enlace α-1,4- glucosídico (C-O-C)
861	857	857		858	857	deformaciones CH y CH ₂
765	762	761		762	762	C-C estiramiento
535-710		708		708	710	modos esqueléticos del anillo de piranosa

Bandas FTIR del almidón normal de maíz (N), del almidón ceroso de maíz (C), del maíz succinatado (NS), del maíz ceroso succinatado (CS), del maíz acetilado (NA), del maíz ceroso acetilado (CA). Extracto de antocianinas (E), microesferas preparadas con: almidón normal succinilidao (MNS), almidón ceroso succinilidao (MCS), almidón almidón normal acetilado (MNA), almidón ceroso acetilado (MCA), almidón normal fosfatado (MNF).

VI.4 Conclusiones

- Las modificaciones de los almidones afectaron las propiedades fisicoquímicas de las microesferas. Las microesferas preparadas con almidones esterificados (MNS, MCS, MNA, MWA, MNF y MCF) presentaron menor tamaño de partícula, mayor solubilidad, mayor retención de antocianinas y eficiencia de encapsulación con relación a los almidones hidrolizados de maíz normal y ceroso.
- Se obtuvieron microesferas con almidones acetilados y succinatados que resultaron ser de forma esférica con alta retención y eficiencia de encapsulación de antocianinas y polifenoles de maíz negro.
- Las microesferas producidas con los almidones fosfatados presentaron una baja retención de antocianinas después del secado por aspersión en comparación con los almidones succinatados y acetilados. También presentaron muy alta higroscopicidad.
- la espectroscopía FTIR reveló la incorporación de nuevos enlaces en los almidones esterificados; también reveló que al no haber formación de nuevos enlaces covalentes entre las antocianinas y los almidones, las interacciones solo fueron de tipo van der waals y de puentes de hidrógeno.
- El secado por aspersión afectó ligeramente el perfil de antocianinas del extracto de maíz, por lo que es un método efectivo para la encapsulación de las mismas.

VI.5 Referencias

- Bakowska-Barczak, A.M., Kolodziejczyk, P.P., (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*.34, 1301-1309.
- Cai, Y.Z., Corke, H., (2000). Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science* 65, 1248-1252.
- Cao, S., Liu, L., Pan, S., Lu, Q., Xu, X., (2009). A Comparison of Two Determination Methods for Studying Degradation Kinetics of the Major Anthocyanins from Blood Orange. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 245-249.
- Cuevas Montilla, E.F., Hillebrand, S.F., Antezana, A.F., Winterhalter, P., 2011. Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry JID* 0374755 .
- da Silva, F.C., da Fonseca, C.R., de Alencar, S.M., Thomazini, M., Balieiro, J.C.d.C., Pittia, P., Favaro-Trindade, C.S., (2013). Assessment of production

- efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food Bioproducts Processing*. 91, 28-36.
- Drusch, S., Schwarz, K., (2006). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *European Food Research and Technology* 222, 155-164.
- Fang, J.M., Fowler, P.A., Sayers, C., Williams, P.A., (2004). The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*. 55, 283-289.
- Fang, Z., Bhandari, B., (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 510-523.
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., Omid, M., (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food Bioproducts Processing*. 90, 667-675.
- Ferrari, C.C., Germer, S.P.M., Alvim, I.D., Vissotto, F.Z., de Aguirre, J.M., (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science Technology* 47, 1237-1245.
- Idham, Z., Muhamad, I. I., Sarmidi, M. R., (2012). Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from hibiscus sabdariffa L. *J. Food Process Eng.* 35, 522-542.
- Jiugao, Y., Jie, L., (1994). Effects of Suspension Crosslinking Reacting Conditions on the Sizes of Starch Microspheres. *Starch - Stärke* 46, 252-255.
- Krishnan, S., Kshirsagar, A.C., Singhal, R.S., (2005). The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*. 62, 309-315.
- Liang, R., Huang, Q., Ma, J., Shoemaker, C.F., Zhong, F., (2013). Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried beta-carotene nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*. 33, 225-233.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C.I., Martínez-Bustos, F., (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 91, 380-386.
- Nagaoka, S., Tobata, H., Takiguchi, Y., Satoh, T., Sakurai, T., Takafuji, M., Ihara, H., (2005). Characterization of cellulose microbeads prepared by a viscose-phase-separation method and their chemical modification with acid anhydride. *Journal of Applied Polymer Science*. 97, 149-157.
- Nijdam, J.J., Langrish, T.A.G., (2006). The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering*. 77, 919-925.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y., Zhao, G., (2013). Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. *LWT – Food Science and Technology* 51, 348-355.
- Rasband, W.S., (2007). ImageJ. U.S. National Institutes of Health, 856 Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html> (accessed 7 September 2014).
- Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J., Santos, J., 2012. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*. 134, 1-8.

- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C.,(2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science Technology* 45, 1386-1394.
- Saéncz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P., (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. 114, 616-622.
- Sáenz, V., Hernáez, E., Sanz, L., Katime, I. (2004). Liberación controlada de fármacos. Microesferas. *Revista iberoamericana de polímeros*. 52, 87-101.
- Singleton, V.L., Rossi, J.J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Tonon, R.V., Alexandre, D., Hubinger, M.D., Cunha, R.L., (2009). Steady and dynamic shear rheological properties of açai pulp (*Euterpe oleraceae Mart.*). *Journal of Food Engineering*. 92, 425-431.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae Mart.*) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 88, 411-418.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* 43, 907-914.
- Xu, B., Chang, S.K.C., (2008). Total Phenolics, Phenolic Acids, Isoflavones, and Anthocyanins and Antioxidant Properties of Yellow and Black Soybeans As Affected by Thermal Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 7165-7175.
- Xu, Y., Miladinov, V., Hanna, M.A., (2004). Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution. *Cereal Chemistry Journal* 81, 735-740.
- Yu, H., Huang, Q., (2010). Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chemistry*. 119, 669-674.
- Zhao, X., Zhang, C., Guigas, C., Ma, Y., Corrales, M., Tauscher, B., Hu, X., (2009). Composition, antimicrobial activity, and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays L.*) from China. *European Food Research and Technology*. 228: 759-765.

VII. ELABORACIÓN DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

VII.1 Introducción

La industria tiene gran interés en la determinación de isotermas de adsorción debido a que proporcionan datos sobre la estabilidad y la vida de anaquel de un producto. Además, pueden proporcionar información importante sobre algunas otras propiedades del proceso, incluido el envasado, el almacenamiento y el diseño y optimización de equipos de secado. En el caso de las microesferas, que se incorporan normalmente en los alimentos o productos farmacéuticos, es importante saber cómo se comportan las microesferas en diferentes entornos. Las isotermas de adsorción describen la relación entre la actividad de agua (a_w) y el contenido de humedad de equilibrio de un determinado material a temperatura constante.

Las isotermas de sorción son la representación gráfica del contenido de humedad presente en el alimento contra la actividad de agua en condiciones isotérmicas, donde el material está en equilibrio higroscópico con el ambiente en que se encuentra y no existe cambio en el peso de la muestra. Son una forma adecuada de analizar el grado de interacción del agua con el sustrato. Normalmente se puede dividir en tres intervalos en función de la a_w : agua fuertemente ligada correspondiente a una a_w de 0.2-0.3 ó inferior, agua moderadamente ligada ($a_w = 0.3-0.7$) y agua poco ligada correspondiente a una a_w de 0.7-0.8 y superior (González-Hurtado, *et al.*, 2014).

En numerosas ocasiones se ha intentado, a partir de mecanismos termodinámicos de adsorción, desarrollar expresiones matemáticas que se ajusten a los distintos datos experimentales obtenidos, teniendo como base las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas. Numerosos modelos matemáticos para la descripción del comportamiento de adsorción de humedad en los alimentos se encuentran disponibles (Ferrari *et al.*, 2012). Algunos de estos modelos se basan en las teorías sobre el mecanismo de adsorción; otros son puramente empíricos o semi empíricos, los criterios utilizados para seleccionar el modelo más apropiado de adsorción son el grado de ajuste a los datos experimentales y del significado del modelo.

El calor de sorción es función directa de la temperatura y la capacidad de adsorción de humedad, y representa el calor involucrado en el fenómeno de adsorción y en la variación de la temperatura (calor cedido del sistema). A bajos contenidos de humedad el calor de sorción se mantiene constante, esto se debe a que a bajos contenidos de humedad el agua está unida fuertemente a los sitios activos de tal forma que el valor de calor de sorción no varía aparentemente, sin embargo, a medida que se incrementa el valor de humedad, el calor de sorción alcanza un máximo en los sistemas evaluados que coincide con el incremento del parámetro fisicoquímico en el valor de la monocapa. A mayor porcentaje de humedad el calor de sorción tiende a disminuir debido a que existirá menor disponibilidad para la interacción agua-sólido (Vega Gálvez et al., 2006).

El objetivo de este trabajo fue determinar los datos de la isoterma de adsorción para las microesferas de antocianinas de maíz a una temperatura de 40 °C, y determinar su estabilidad a diferentes humedades relativas. También analizar el efecto de la esterificación con anhídrido acético y con *n*-OSA en el comportamiento de adsorción de agua. El mejor material de pared fue evaluado también a 30 y 4 °C.

VII.2 Materiales y métodos

VII.2.1 Modelado de las isotermas de adsorción de las microesferas

En el método estático para la elaboración de isotermas de adsorción, las muestras se colocan en recipientes cerrados a humedades relativas constantes, hasta alcanzar un equilibrio higroscópico. Las isotermas de adsorción de las diferentes microesferas (MN, MNS, MNA, MW, MWS y MWA) se determinaron por gravimetría. Las muestras se introdujeron en varios desecadores de vidrio, que contenían P₂O₅ como desecante, a temperatura ambiente durante 3 semanas a fin de reducir al mínimo la humedad relativa de las microesferas. Se colocaron aproximadamente 1 g de microcápsulas en placas de poliestireno, las cuales se colocaron en frascos sellados de 10 cm de diámetro, conteniendo cada uno una de las siguientes soluciones saturadas: LiCl, CH₃CO₂K, KCl, K₂CO₃, Mg (NO₃)₂, NaCl, KCl, BaCl. Los valores correspondientes de la actividad de agua fueron: 0.11, 0.22, 0.33, 0.42, 0.52, 0.75, 0.84 y 0.94, respectivamente. Entonces estos frascos se colocaron en el horno de secado por convección forzada a 40 °C hasta que se alcanzó el equilibrio. Las microesferas que presentaron mayor retención de antocianinas (Sección VII.2.2), también se evaluaron a temperaturas de 30 y 4 °C. En base a los resultados obtenidos se construyeron las isotermas de adsorción (Ferrari *et al.*, 2012). Se seleccionaron los modelos de isotermas de adsorción GAB, Peleg, Henderson y Caurie para ajustar los datos experimentales. Estos modelos son expresados por las Ecuaciones VII.1- 4, respectivamente.

Modelo de GAB:

$$X = \frac{X_0 CKa_w}{(1-Ka_w)(1-Ka_w + CKa_w)} \dots\dots\dots \text{Ecuación VII. 1.}$$

Donde M es el contenido de humedad en la muestra (g de agua por 100 g de polvo seco), X₀ es el contenido de humedad en la monocapa, C es la constante de

Guggenheim, y K es la constante de corrección propiedad de la multicapa con respecto a la densidad aparente.

Modelo de Peleg:

$$X = k_1 \cdot a_w^{n_1} + k_2 a_w^{n_2} \dots\dots\dots \text{Ecuación VII. 2.}$$

donde X es el contenido de humedad en la muestra (g de agua por 100 g de polvo seco); a_w , es la actividad de agua y k_1 , k_2 , n_1 y n_2 son los parámetros de la ecuación (Peleg, 1993). Análisis estadísticos de regresión no lineal se realizaron utilizando SigmaPlot versión 10.0 (Systat Software, Inc., EE.UU.).

Modelo de Henderson:

$$X = 0.01 \left[\frac{-\log(1-a_w)}{10^f} \right]^{1/n} \dots\dots\dots \text{Ecuación VII. 3}$$

n y f son constantes propias del modelo

Modelo de Caurie:

$$X = \exp \left[a_w \cdot \ln(v) - \frac{1}{4.5 \cdot X_s} \right]^{1/n} \dots\dots\dots \text{Ecuación VII. 4.}$$

donde v es una constante característica del material y X_s el contenido en humedad de seguridad que proporciona la máxima estabilidad al alimento deshidratado durante el almacenamiento (kg agua/kg sólido seco). Este modelo suele dar buenos resultados para muchos alimentos en el intervalo de a_w 0-0.85.

Los modelos presentados, fueron ajustados a los resultados experimentales mediante la programación de las Ecuaciones VII.1-4 en el software Sigma Plot versión 10 (Systat Software Inc).

La calidad del ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el módulo de desviación relativa (E), que se define de la siguiente manera:

$$E = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{M_i - M_{pi}}{M_i} \right| \dots \dots \dots \text{Ecuación VII. 5.}$$

donde M_i es el valor experimental, M_{pi} es el valor predicho, y N es el número de datos experimentales. La media relativa del módulo de desviación porcentual (E) es ampliamente adoptado a través de la literatura: un módulo por debajo del 10 % indica un buen ajuste para fines prácticos (Cova *et al.*, 2010).

VII.2.2 Estabilidad de las antocianinas encapsuladas

Para probar la estabilidad de las microesferas, éstas se colocaron en charolas, de tal manera que quedara expuesta una mayor área superficial. Las muestras fueron almacenadas a 40 ° C durante 30 días para los estudios de estabilidad en un cuarto oscuro. En el caso de las microesferas de MNS, éstas también se evaluaron a 30 y 4°C. El porcentaje de retención de antocianinas al final del periodo se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$AR = \frac{TAC_f \text{ (mg/g)}}{TAC_o \text{ (mg/g)}} \times 100, \dots \dots \dots \text{Ecuación VII. 6.}$$

donde TAC_f es el contenido de antocianinas totales después de secado por aspersion y TAC_o es el contenido de antocianinas totales antes de secado por aspersion.

VII.2.3 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizó el programa Sigma-Stat, versión 3.01 (Systat, 2006) para llevar a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) con el fin de determinar las diferencias entre medias de los tratamientos. Las medias de los tratamientos se consideraron significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ utilizando procedimientos de comparación múltiple por parejas (prueba de Tukey). Las isothermas se graficaron utilizando SigmaPlot Versión 10 (Systat Software Inc., 2006).

VII.3 Resultados y discusión

VII.3.1 Isothermas de adsorción de las microesferas a 40 °C

Las isothermas de los datos experimentales preparadas a 40 °C para MN, MNS, MNA, MW, MWS, MWA fueron ajustadas a los modelos de GAB, Peleg, Henderson y Caurie. El contenido de humedad en equilibrio representa el promedio de tres repeticiones. La desviación estándar de la humedad en equilibrio para cada punto se encontró dentro de 0.0003–0.001 (g H₂O/ 100 de microesferas).

Las isothermas se muestran en las **Figuras VII.1-VII.6**, éstas mostraron forma sigmoidea correspondiente a la clasificación de tipo II de acuerdo a la clasificación de BET. Este tipo de isoterma se ha encontrado en los siguientes trabajos: 1.) en microesferas de açai utilizando almidón de piñón como material de pared (Thys *et al.*, 2010); 2. para jugo de limón encapsulado con mezclas de maltodextrinas y goma arábica (Martinelli *et al.*, 2007); y 3. Para microesferas de beta-caroteno encapsuladas en almidón *n*-OSA (Liang *et al.*, 2013). Las isothermas de tipo II son características de productos solubles que muestran una tendencia asintótica a medida que la actividad de agua se acerca a la unidad, además presenta un punto de inflexión a valores bajos de a_w .

Las isothermas sigmoideas pueden dividirse generalmente en tres regiones, la region I que corresponde a $a_w < 0.22$, que se refiere a la adsorción de agua en la capa monomolecular (X_0), la región II para a_w entre 0.22-0.73, correspondiente a la adsorción de agua en capas adicionales a las X_0 , y la región III para a_w entre 0.73-1.0. Se observó en todas las isothermas que el contenido de humedad aumentó a medida que se incrementó el valor de la a_w . Este comportamiento es típico en biopolímeros hidrofílicos sensibles al vapor de agua, como películas de almidón, gluten y celulosa. La adsorción de vapor de agua en productos amiláceos ocurre principalmente entre los puentes de hidrógeno de las moléculas de agua y los productos hidroxilo de las moléculas de almidón, los cuales se comportan como centros activos de adsorción por su condición polar (Cladera-Olivera *et al.*, 2011).

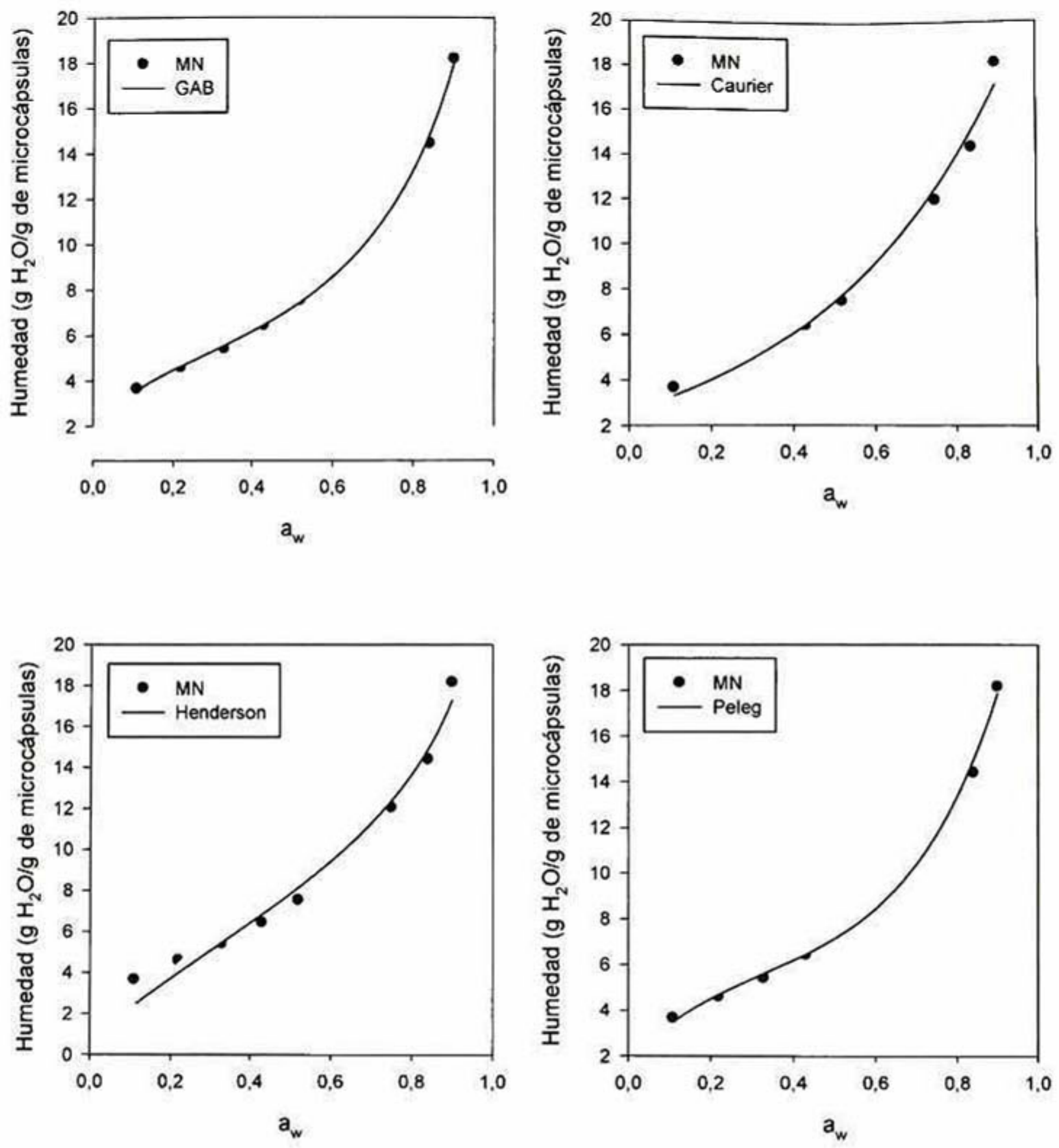


Figura VII. 1. Isothermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal hidrolizado

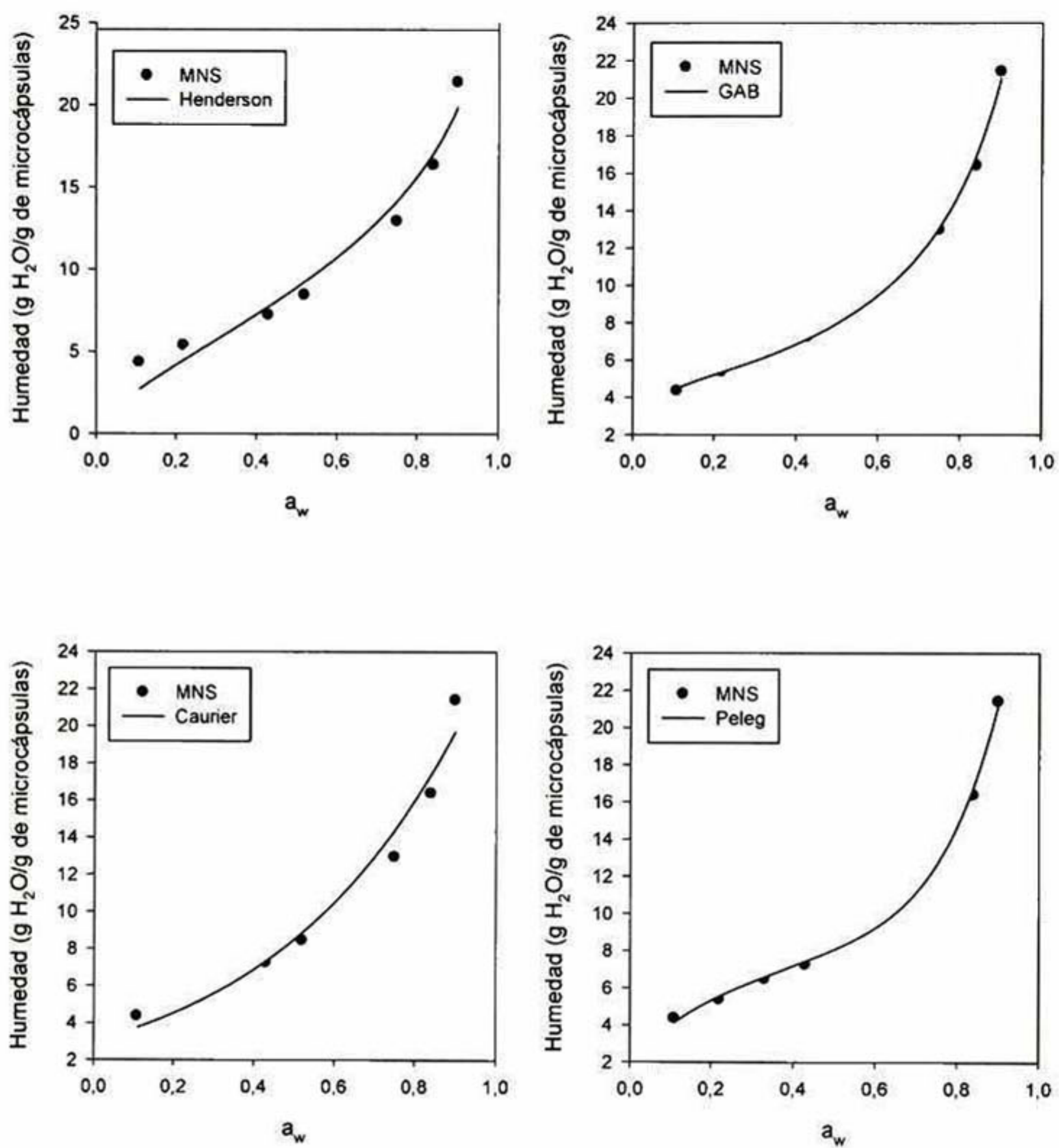


Figura VII. 2. Isothermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal succinatado.

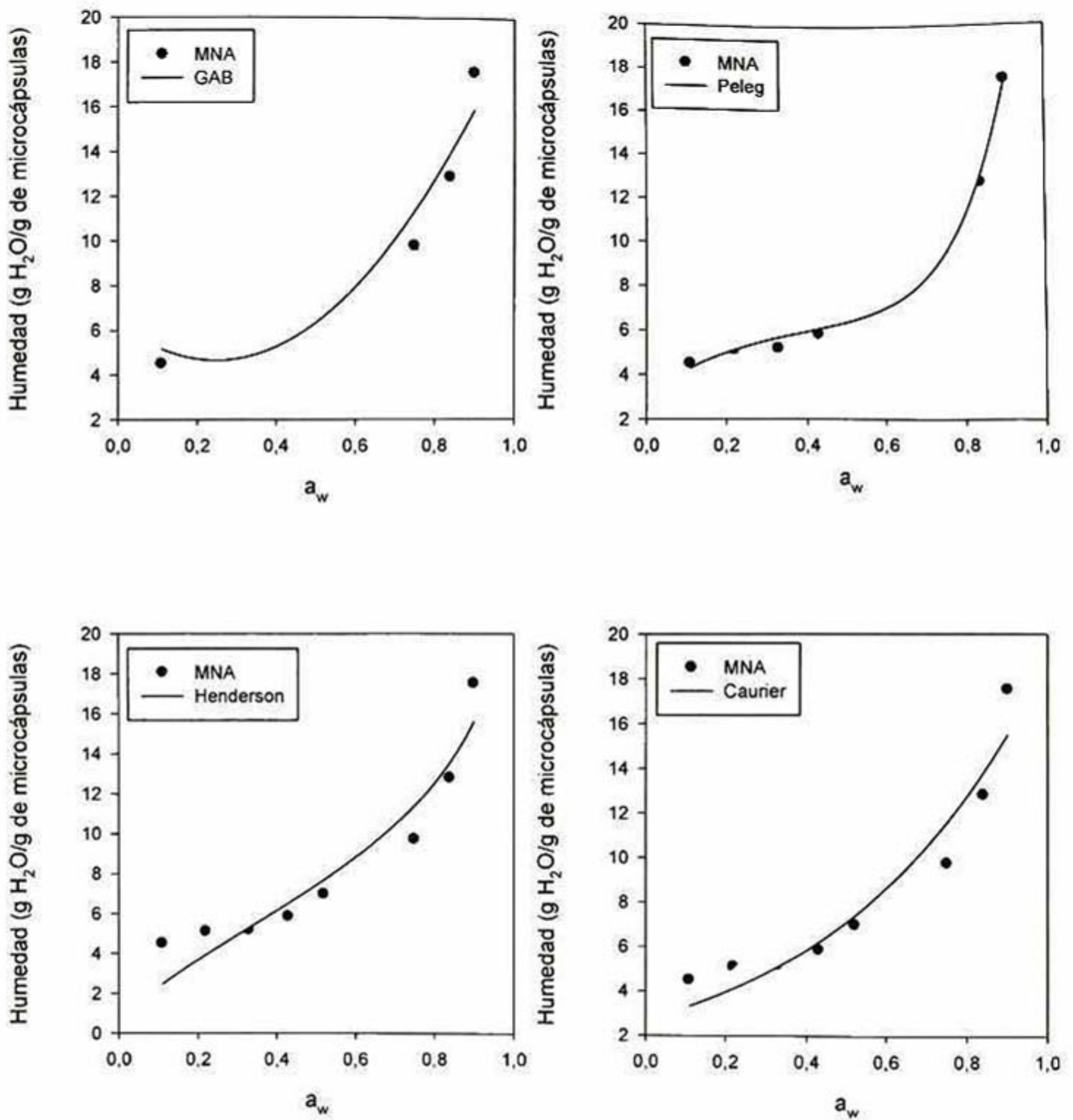


Figura VII. 3. Isothermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal acetilado

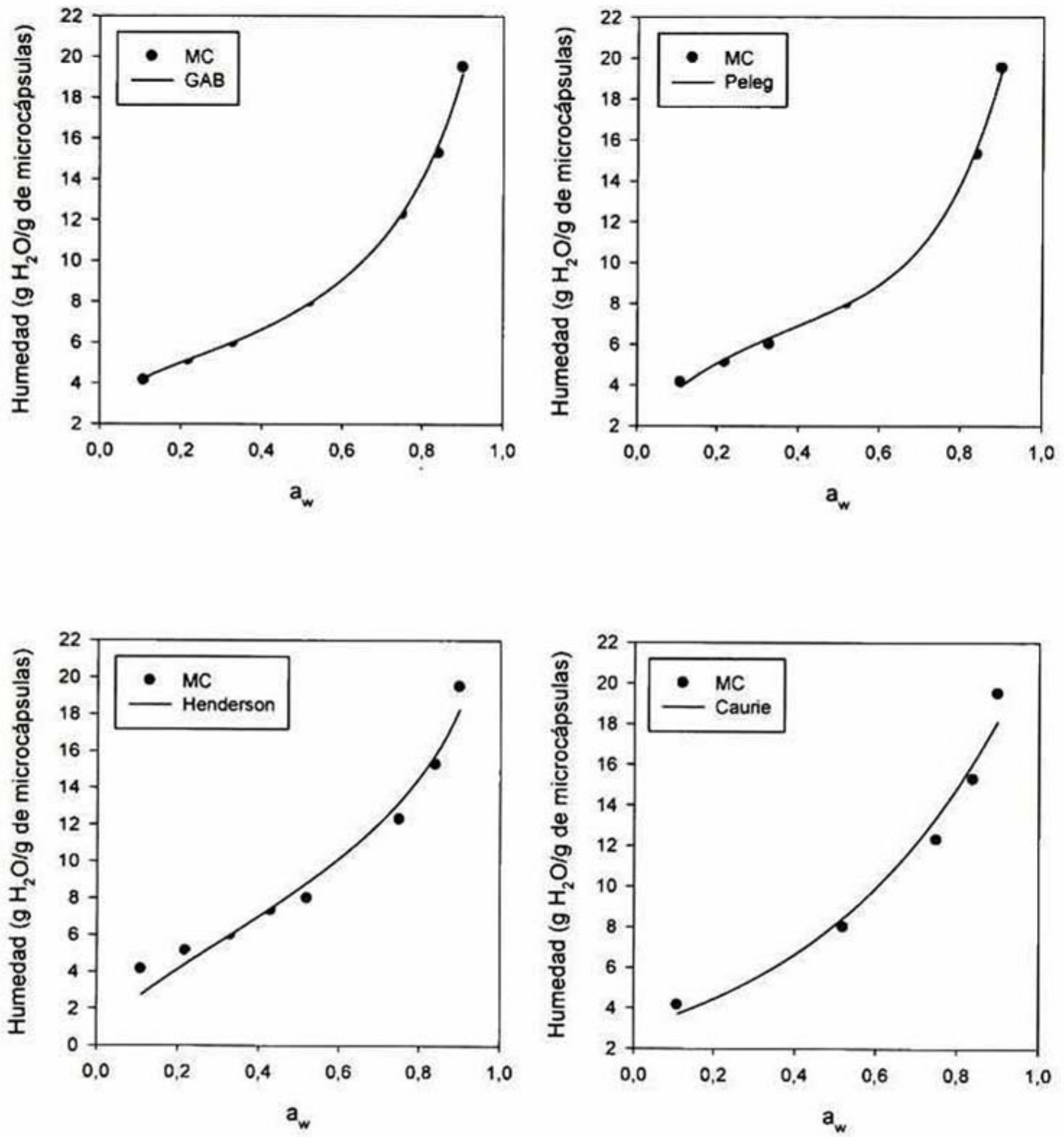


Figura VII. 4. Isothermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz ceroso hidrolizado

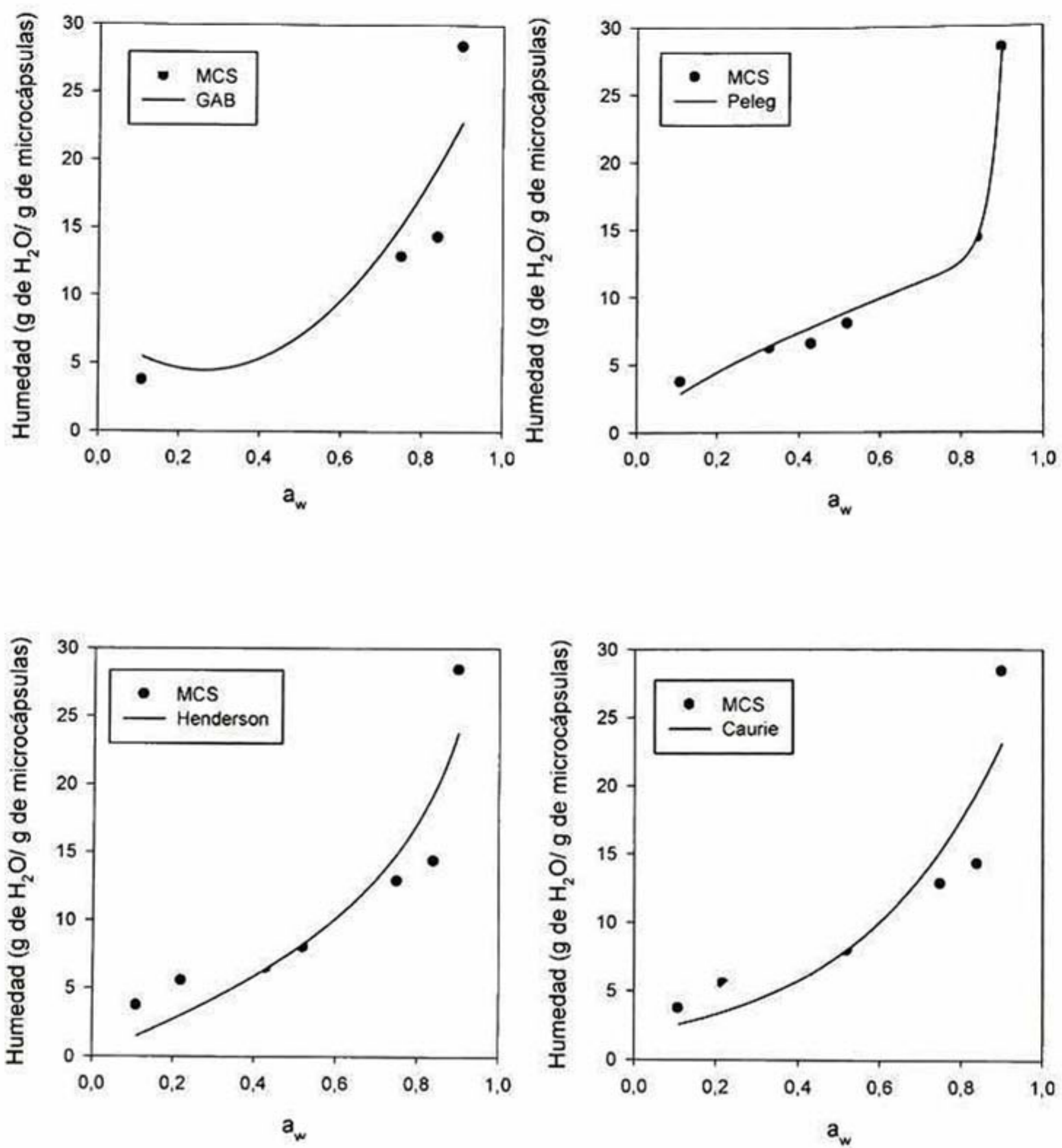


Figura VII. 5. Isothermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz ceroso succinatado

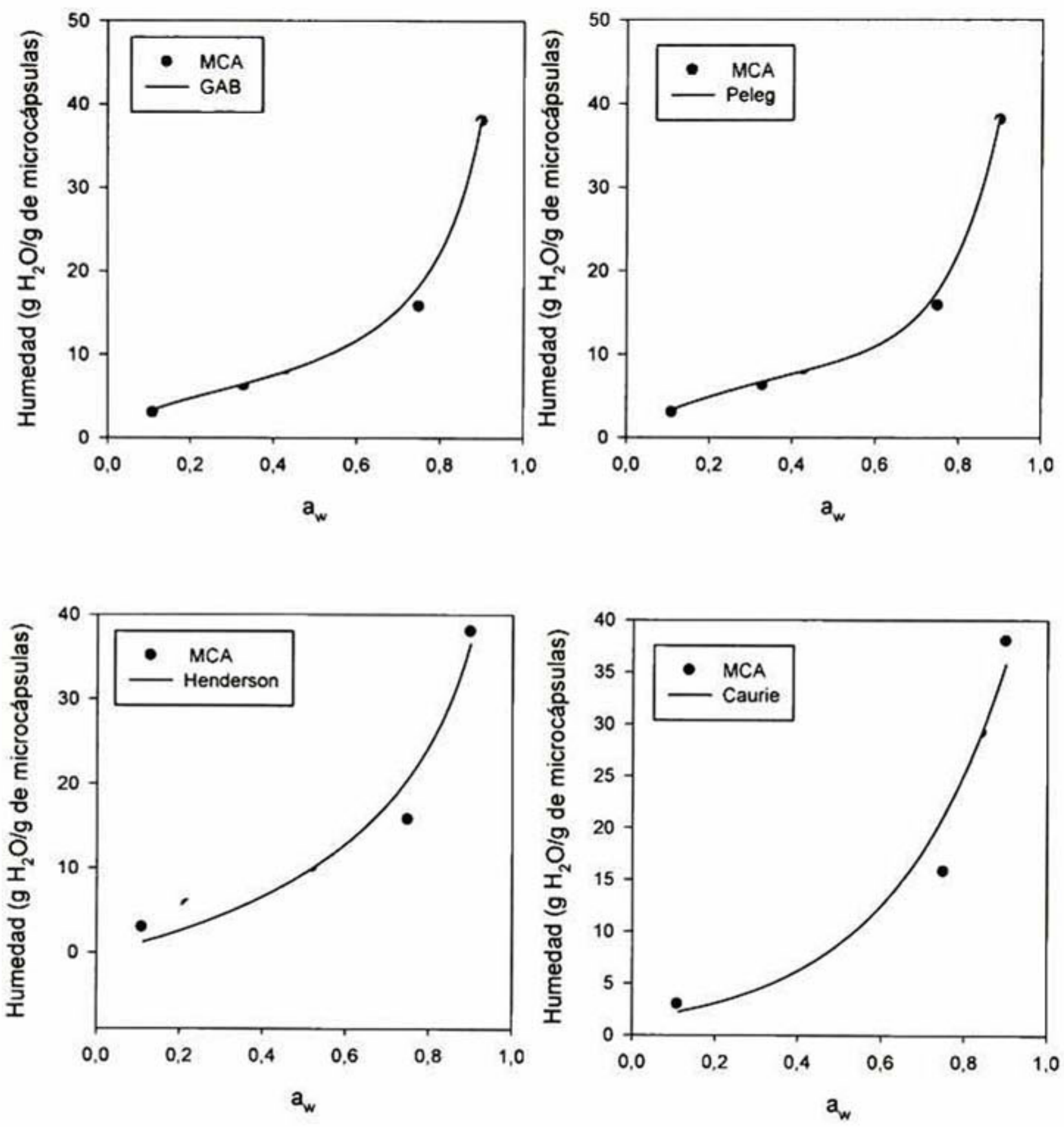


Figura VII. 6. Isothermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz ceroso acetilado

A diferencia de los modelos de Peleg, Henderson y Caurie, el modelo de GAB tiene la ventaja de suministrar valiosa información sobre el contenido de humedad en la capa monomolecular (X_0), siendo este parámetro fundamental para definir las condiciones de almacenamiento de las microesferas. El X_0 indica la cantidad de agua que está fuertemente adsorbida en los sitios activos del sólido del alimento y se considera como el valor en el cual el alimento es más estable durante el almacenamiento. Además, el conocimiento de esta humedad es importante en los alimentos para la determinación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y el control de las reacciones de deterioro. El valor de humedad en la monocapa (X_0) de las microesferas de antocianinas se puede observar en el **Cuadro VII.1**. X_0 se define como "la saturación de grupos polares correspondientes a agua adsorbida en los sitios más activos y en el cual en el valor de la monocapa debe ser estable al deterioro microbiano" (Bonilla *et al.*, 2010). Los valores de X_0 se encontraron entre 3.674 y 5.084 (gH₂O/ 100 g de microesferas), dichos valores son menores a 7.1, valor reportado para microesferas producidas con maltodextrinas (Ferrari *et al.*, 2012). Por otra parte, los valores obtenidos fueron mayores a 3.1g, valor reportado para microesferas producidas con almidón nativo de tapioca (Tonon *et al.*, 2009). Dichos resultados sugieren que entre más hidrolizados se encuentren los almidones mayor será el valor de X_0 , debido a existencia de más grupos polares.

De acuerdo a los resultados que se presentan en el **Cuadro VII.1**. Es posible observar que el modelo de GAB se adaptó bien a todas las isotérmicas con excepción de MWS, sin embargo, la isoterma de MWS se adaptó muy bien al modelo de Peleg, también con el uso de éste modelo se mejoró el ajuste para MNA. Ya se ha reportado que el modelo de Peleg se ajusta también como el modelo de GAB ó mejor (Peng *et al.*, 2013, Spada *et al.*, 2012). Los modelos de Henderson y Caurie presentaron bajos ajustes en comparación con los demás modelos.

Al comparar el comportamiento de las isotermas de adsorción de MN y MW con respecto a las isotermas de adsorción de MNA y la MWA, se observó que MNA exhibió un menor valor de X_0 que MN, por el contrario la MWA mostró un mayor valor de X_0 de MW. La incorporación de grupos acetilo hidrófobos en el almidón hidrolizado normal, y su posterior extrusión disminuyó la adsorción de agua en microesferas. Una explicación de los resultados se basa en los cambios de la

estructura que se producen durante la acetilación y la extrusión en la MWA. Estos cambios se reflejan en mayores centros de adsorción en MWA que en MNA, en el que, una mayor cantidad de moléculas de vapor de agua se enlazan (Włodarczyk-Stasiak y Jamroz, 2008).

Comparando los resultados de X_0 de MN y MW con respecto a MNS y MWS, se observó un ligero aumento en X_0 en ambos almidones succinatados. El grupo *n*-OSA al tener una cadena hidrocarbonada más larga, incrementa la hidrofobicidad del almidón a medida que se obtiene un mayor grado de sustitución sin embargo, después de la extrusión se generaron más grupos polares que favorecieron la absorción de agua. Los valores más altos de X_0 obtenidos en el presente trabajo están acordes con el mayor valor de WSI y WAI (ver **Cuadro IV. 1**).

El valor de *C* carece de cualquier significado físico, y es el resultado de la compensación matemática entre los parámetros de la ecuación, que se produce en cualquier procedimiento de ajuste de curvas. El valor *C* osciló entre -30.61 y 90.75.

El valor de *K* proporciona una medida de la interacción de las moléculas en las multicapas con el adsorbente, y tiende a caer entre el valor de la energía de las moléculas en la monocapa y la de agua líquida. Cuando *K* es igual a 1 las multicapas tienen las propiedades de agua líquida. Los valores de *K* oscilaron entre 0.817 y 0.961

1 Cuadro VII. 1. Parámetros de ajuste para los modelos propuestos para las isotermas de adsorción elaboradas a 40°C.

Modelo	Parámetro	MN	MW	MNS	MWS	MNA	MWA
GAB	Xm	4.398	4.623	4.5647	4.217	3.674	5.084
	C	26.171	26.490	76.9980	90.75	-30.608	10.860
	k	0.869	0.817	0.8712	0.901	0.889	0.961
	r ²	0.991	0.995	0.9967	0.849	0.974	0.988
Peleg	E	3.833	7.002	2.0212	8.824	8.176	3.86
	k ₁	15.742	18.712	22.502	388.958	22.438	58.71
	n ₁	4.804	6.325	6.643	30.809	7.604	7.737
	k ₂	8.775	10.196	10.512	14.313	7.523	13.538
	n ₂	0.417	0.435	0.424	0.7280	0.256	0.634
	r ²	0.997	0.998	0.997	0.989	0.995	0.992
	%E	2.270	6.871	2.3208	8.955	8.142	3.089
	n	1.5168	1.5733	1.4948	1.0792	1.6160	1.5733
Henderson	f	-4.9118	-5.1319	-4.589	-3.6440	-5.1614	-3.1387
	r ²	0.9819	0.9723	0.9659	0.860	0.9099	0.9658
	%E	8.1308	23.71	8.0961	22.1657	13.9358	19.2731
	X _S	-0.2292	-0.2039	-0.2044	-0.3488	-0.2251	-0.5220
Caurie	v	8.0274	7.4632	8.2101	16.172	7.0227	33.217
	r ²	0.9887	0.9783	0.9721	0.8478	0.9260	0.9608
	%E	4.4582	6.0685	7.2585	18.83	10.7450	16.6153

2 M N: microcápsula de almidón normal; MNA: microcápsula de almidón acetilado; MW: microcápsula de almidón ceroso; MWA:

3 microcápsula de almidón ceroso acetilado. R²: regression coefficient

4

VII.3.2 Estabilidad de las antocianinas encapsuladas

La retención de antocianinas (RA) después de 30 días de almacenamiento bajo diferentes actividades de agua se muestra en el **Cuadro VII.2**. El aumento de la actividad de agua provocó una disminución en la RA después del almacenamiento, lo cual, es debido al hecho de que las antocianinas son sensibles a la degradación como resultado de reacciones de hidratación. La influencia negativa de la humedad en la estabilidad de las antocianinas ha sido observada por diferentes investigadores (Osorio *et al.*, 2010; Pavón-García *et al.*, 2011).

La esterificación de los almidones normal y ceroso (hidrolizados), con excepción del almidón ceroso acetilado, incrementó la retención de antocianinas a actividades de agua de 0.11 y 0.52. Los grupos hidrofóbicos esterificados podrían estar evitando la hidratación y posterior degradación de las antocianinas. Como se observó en el **Cuadro VII.1.**, las Microesferas producidas con el almidón ceroso acetilado presentaron el valor más alto de X_0 , lo cual sugiere que; entre mayor sea el valor de X_0 , menor será la retención de antocianinas.

Se observa en el **Cuadro VII.2** que para a_w entre 0.11 y 0.75, MNS y MNA presentaron los más altos valores de AR. Sin embargo, a a_w iguales a 0.84 y 0.94, se observó una drástica disminución en los valores de AR para MNA y MNS respectivamente. A $a_w = 0.94$, MN y MW mostraron mayor RA en comparación con las microesferas preparadas con los almidones esterificados; en el caso de MNA no fueron identificadas antocianinas al final del experimento.

Al comparar las microesferas elaboradas con los almidones: normal y ceroso hidrolizado, se observó que las elaboradas con almidón ceroso hidrolizado presentaron mejores retenciones. Sin embargo, caso contrario ocurrió con los almidones esterificados, ya que en el **Cuadro VII.2** se observa que los almidones normales esterificados con anhídrido acético ó con *n*-OSA, presentaron mejores retenciones de antocianinas con relación a los almidones cerosos, siendo las microesferas elaboradas con almidón normal succinatado, las más estables. Se especula que el contenido de amilosa juega un papel muy importante en la formación estructural de las microesferas.....

Cuadro VII. 2. Retención de antocianinas (RA) después de 30 días de almacenamiento a 40 °C.

%H	MN	MNS	MNA	MC	MCS	MCA
11	71.84±0.57 ^a	99.16±0.46 ^d	88.14±0.50 ^c	72.19±1.22 ^a	75.62±0.33 ^d	73.04±0.66 ^a
22	70.53±0.80 ^a	87.04±0.62 ^b	85.70±1.17 ^b	71.52±1.14 ^c	75.04±0.65 ^c	71.03±0.66 ^d
33	68.63±1.08 ^a	81.03±0.62 ^b	84.04±0.64 ^c	72.02±1.19 ^d	64.04±0.65 ^e	58.71±1.19 ^f
42	67.78±0.82 ^a	80.41±1.28 ^b	80.85±0.73 ^b	70.54±1.23 ^c	58.18±0.45 ^d	53.42±0.38 ^e
52	66.47±0.56 ^a	77.01±0.44 ^b	74.94±0.79 ^b	66.20±1.77 ^a	58.05±0.62 ^c	52.30±0.37 ^d
75	57.61±0.55 ^a	70.19±0.66 ^b	67.33±0.79 ^c	56.27±1.19 ^a	50.04±0.65 ^d	52.21±0.67 ^d
84	52.51±1.05 ^a	57.18±0.65 ^b	27.05±0.62 ^c	54.91±1.05 ^d	15.17±0.47 ^e	4.07±0.63 ^f
94	33.43±0.66 ^a	20.04±0.62 ^b	0	53.59±0.91 ^c	8.03±5.23 ^d	5.23±0.42 ^e

MN: microcápsula de almidón normal hidrolizado, MNS: microcápsula de almidón normal succinato, MNA: microesferas de almidón normal acetilado, MC: microesferas de almidón normal hidrolizado, MCS: microesferas de almidón ceroso succinato, MCA: microesferas de almidón ceroso acetilado. ¹Media aritmética de tres repeticiones ± error estándar. Letras iguales dentro la misma fila, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

VII.3.3 Isotermas de adsorción del almidón succinatado a 30 y 4°C

El efecto de la temperatura en las isotermas de adsorción elaboradas con almidón normal succinatado se observa en la **Figura VII.7**. Los resultados mostraron un comportamiento similar a lo reportado por otros autores (Ferrari *et al.*, 2012, Gabas *et al.*, 2007). Se observó que para una determinada actividad de agua, el contenido de humedad disminuye al incrementarse la temperatura. Este fenómeno fue explicado por Palipane y Driscoll (1992) basados en los mayores niveles de energía y la baja estabilidad de las moléculas de agua a altas temperaturas, favoreciendo de esta forma, su separación de los sitios activos presentes en la matriz del alimento

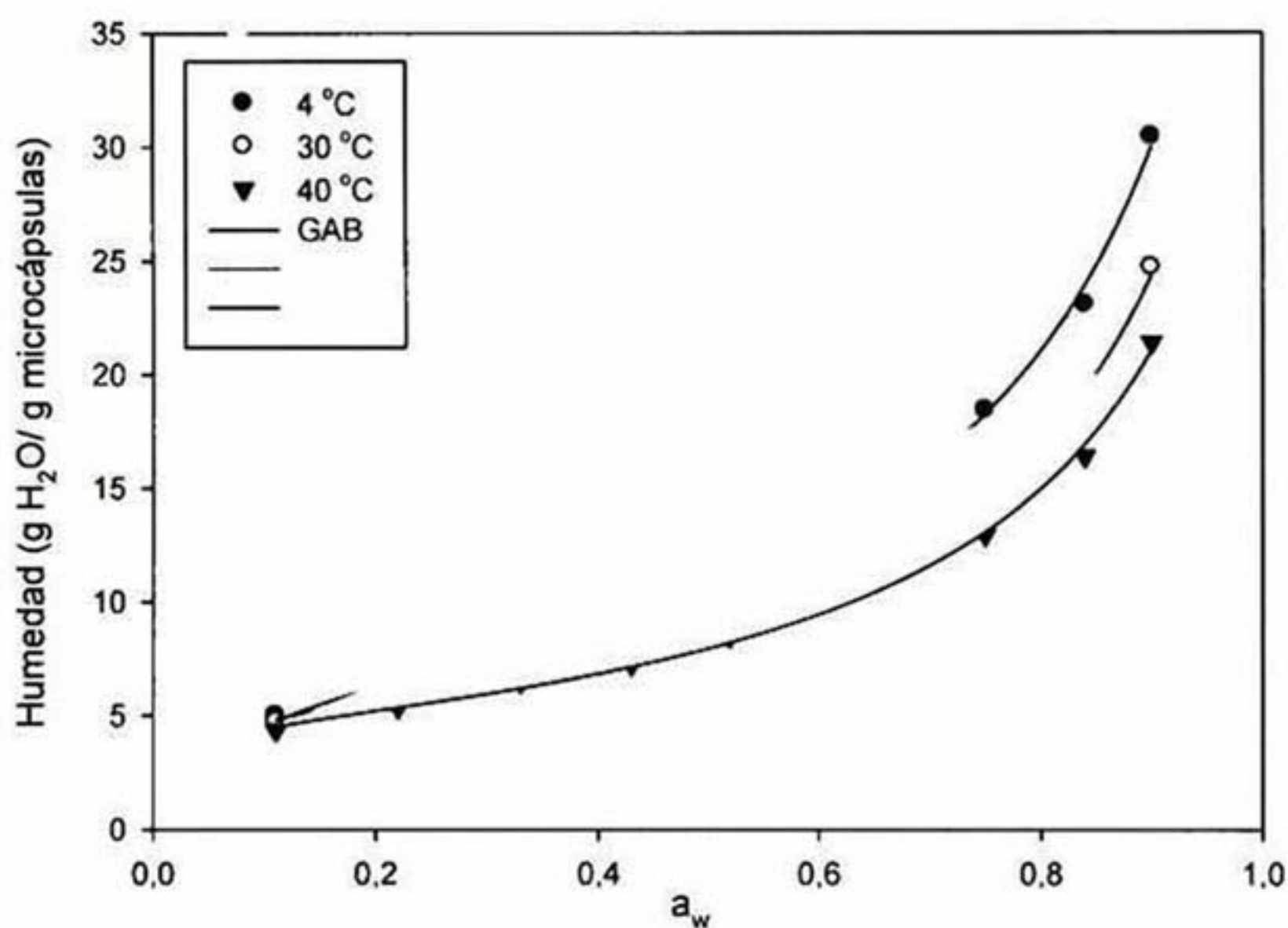


Figura VII. 7. Isotermas de adsorción de microesferas de antocianinas de maíz preparadas con almidón de maíz normal succinatado a 4, 30 y 40 °C.

Se presentan los parámetros estimados para los modelos de GAB, Peleg, Henderson y Caurie en el **Cuadro VII.3**. El modelo de GAB mostró un buen ajuste a los datos experimentales, con altos coeficientes de determinación ($R^2 > 0.99$). Los valores de las constantes C_{GAB} y K_{GAB} están de acuerdo con los valores límite sugeridos por Lewicki (1997), basado en el análisis matemático del modelo. Para las curvas de tipo sigmoideal, Lewicki estipuló que las constantes se deben encontrar entre los siguientes valores $0.24 \leq K_{GAB} \leq 1.00$ and $5.6 \leq C_{GAB} \leq \infty$ para garantizar una buena descripción del modelo de GAB.

Como se mencionó anteriormente, el valor del contenido de humedad monocapa (X_0) es de particular interés, ya que indica la cantidad de agua que está fuertemente adsorbida en sitios específicos en la superficie de los alimentos y se considera como el valor óptimo para asegurar la estabilidad de los alimentos.

Se observó una disminución en X_0 a medida que aumentó la temperatura, la misma tendencia fue observada por Gabas *et al.*, (2007). Cova *et al.*, (2010) reportaron un valor de 6.37 g H₂O/100 para isotermas a 25 °C preparadas con almidón succinatado de yuca con un grado de sustitución de 0.024 y un valor de 5.12 g H₂O/100 g para un grado de sustitución de 0.031, ellos explican que a mayor grado de sustitución menor es el valor de X_0 . Dicho fenómeno no fue posible observarlo debido a la posterior extrusión de los almidones esterificados. Estos valores son similares al obtenido para las microesferas elaboradas con almidón de maíz normal succinatado con un grado de sustitución mayor (0.064). Cabe señalar que la extrusión del almidón favoreció la formación de puentes de hidrógeno.

Cuadro VII. 3. Parámetros de ajuste para los modelos propuestos para las isotermas de adsorción de MNS elaboradas a 4, 30 y 40°C.

Modelo	Parámetro	Temperaturas		
		4 °C	30 °C	40 °C
GAB	X_0	6.4374	5.0306	4.5647
	C	18.7981	62.9151	76.9980
	k	0.8763	0.8826	0.8712
	r^2	0.9955	0.9972	0.9967
	E	3.4855	1.9266	2.0212
Peleg	k_1	31.005	26.951	22.502
	n_1	7.171	6.842	6.643
	k_2	16.648	11.973	10.512
	n_2	0.624	0.453	0.424
	r^2	0.993	0.996	0.997
	%E	4.5520	6.6329	2.3208
Henderson	n	1.3268	1.4207	1.4948
	f	-4.931	-4.776	-4.589
	r^2	0.9827	0.9676	0.9659
	%E	10.6519	10.5551	8.0961
Caurie	X_S	0.1812	0.1951	0.2044
	v	10.5518	9.0831	8.2101
	r^2	0.9830	0.9724	0.9721
	%E	5.3034	7.5648	7.2585

VII.3.4 Estabilidad de las microesferas de almidón succinatado

Los datos obtenidos en el Cuadro VII. 4, revelan que la degradación de antocianinas fue mayor a medida que se incrementó la actividad de agua y se incrementó con el aumento de la temperatura a humedades relativas de entre el 22 y 84 %. Se observó que cuando las microesferas se almacenaron a 84 %, se presentó una drástica disminución de antocianinas a temperaturas de 30 y 40 °C; en cambio, a 4 °C la retención de antocianinas fue mayor. Osorio *et al.*, (2011) reportaron que la cinética de degradación de antocianinas de corozo (palma de cebo) encapsuladas fue en mayor medida afectada por la humedad del medio ambiente, que por la temperatura. Cabe señalar que al término del experimento, las microesferas almacenadas a 30 y 40 °C presentaron una coloración café, la cual, es característica de la formación de chalconas o cumarinas, que se producen por la oxidación de las antocianinas.

Cuadro VII. 4. Retención de antocianinas después de 30 días de almacenamiento a 30 y 4 °C.

¹ %H	40 °C	30 °C	4 °C
11	99.16±0.46	98.62±0.56	99.70±0.36
22	87.04± 0.62	95.68±1.52	97.93±0.65
33	81.03± 0.62	94.58±1.07	97.51±1.45
42	80.41± 1.28	92.51±0.75	96.75±1.08
52	77.01± 0.44	87.68±2.83	94.58±0.00
75	70.19± 0.66	79.88±7.25	93.89±0.00
84	57.18± 0.65	80.80±0.00	92.99±0.00
94	20.04± 0.62	19.08±2.72	64.95±0.00

¹%H: humedad relativa. ¹Media aritmética de tres repeticiones ± error estándar.

VII.3.5 Calor isostérico de adsorción

El calor isostérico neto de adsorción (QS) se define como el calor total de adsorción de agua del alimento (ΔH) menos el calor de vaporización de agua pura (ΔH_V), a una determinada temperatura, y se calculó por medio de la ecuación de Clausius Clayperon, al graficar el $\ln a_w$ versus $1/T$ (K). La **Figura VII. 8** muestra que el calor total de adsorción disminuye al aumentar el contenido de humedad de las microesferas, lo que concuerda con las observaciones por muchos investigadores (Fasina y Sokhansanj, 1993) debido a que menor sea el contenido de humedad, mayor es la cantidad de energía necesaria para eliminar el agua del producto. La curva muestra la cantidad de calor necesario para remover el agua de las microesferas, iniciando con 0.2g H₂O/g de polvo en base seca. La **Figura VII. 9** también muestra que el calor de adsorción de las microesferas alcanza el calor de vaporización del agua (44 kJ/mol) pura a un contenido de humedad de aproximadamente el 6 %.

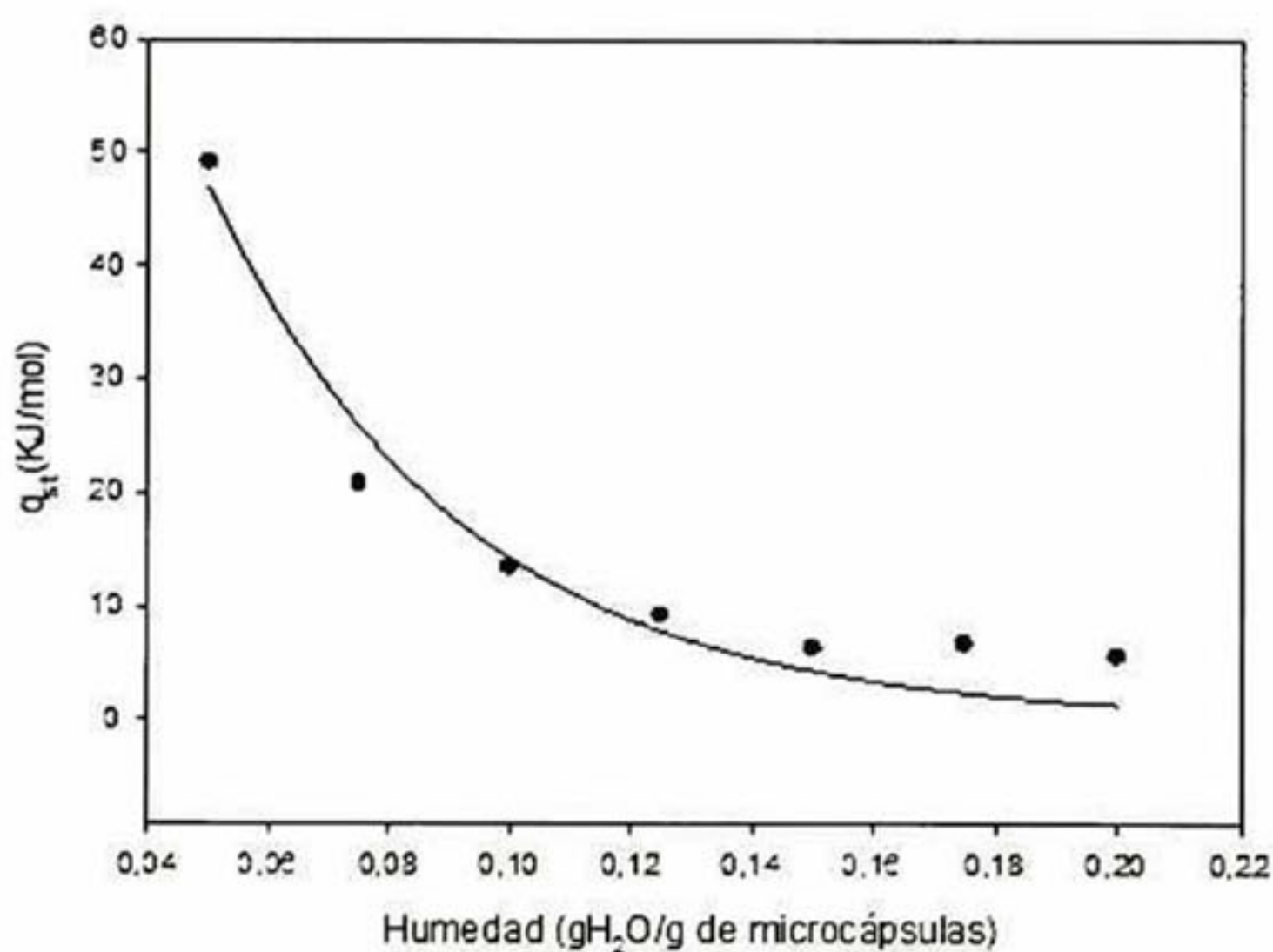


Figura VII. 8. Calor isostérico de adsorción de agua para microesferas de antocianinas preparadas con almidón succinatado.

VII.4 Conclusiones

- Las isothermas de adsorción mostraron forma sigmoidea de la clasificación tipo II. Éstas fueron bien representadas por los modelos de GAB y Peleg.
- La retención de antocianinas durante el almacenamiento se mejoró gracias a la esterificación, en MNA, MNS y MWS en un intervalo de a_w de entre 0.11 y 0.74, caso contrario sucedió con MWA.
- MWA presentó el valor más alto de X_o , lo cual fue desfavorable ya que presentó la menor retención de antocianinas.
- Las microesferas preparadas con almidón de maíz succinatado, presentaron una mayor retención de antocianinas después de ser almacenadas durante 30 días a 40 °C a diferentes humedades relativas.
- El calor isostérico de adsorción disminuyó a medida que se incrementó la humedad de las microesferas.
- Las antocianinas en las microesferas: MNS y MNA, almacenadas a 40 °C, pueden ser estables en alimentos deshidratados que contengan $a_w < 0.52$. Con una retención de antocianinas mayor al 70 % después de 30 días de almacenamiento. Las microesferas MNS al ser las más estables, pueden ser adicionadas a alimentos que contengan $a_w < 0.84$ y que se almacenen a temperaturas < 30 °C.
- Las microesferas de antocianinas de maíz elaboradas con almidón de maíz normal succinatado, pueden ser adicionadas a productos que se almacenen a temperatura ambiente como: alimentos en polvo, mermeladas, frutos deshidratados, pastas, cereales y galletas.

VII.5 Referencias

- Bonilla, E., Azuara, E., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J., (2010). Predicting suitable storage conditions for spray-dried microcapsules formed with different biopolymer matrices. *Food Hydrocolloids*. 24, 633-640.
- Cladera-Olivera, F., Marczak, L.D.F., Noreña, C.P.Z., Pettermann, A.C., (2011). Modeling water adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) flour and thermodynamic analysis of the adsorption process. *Journal of Food Process Engineering*. 34, 826-843.
- Ferrari, C.C., Germer, S.P.M., Alvim, I.D., Vissotto, F.Z., de Aguirre, J.M., (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science Technology* 47, 1237-1245.
- Galvez, Antonio Vega; Aravena, Elena Lara; Mondaca, Roberto Lemus. Isotermas de adsorción en harina de maíz (*Zea mays* L.) (2006). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 4, Dec.
- Conzález-Hurtado, M. I., Porras-Barrientos, L. D., Agudelo-Florez, A. C., Quintero-Cardona, O. A., Diosa-Quintero, C. F., (2014). Determinación de isotermas de desorción en jamón de cerdo cocido almacenado entre 4°C y 12°C. 2014. *Revista de la facultad de química farmacéutica*. 21: 97-106
- Liang, R., Huang, Q., Ma, J., Shoemaker, C.F., Zhong, F., (2013). Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried beta-carotene nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*. 33, 225-233.
- Martinelli, L., Gabas, A.L., Telis-Romero, J., (2007). Thermodynamic and Quality Properties of Lemon Juice Powder as Affected by Maltodextrin and Arabic Gum. *Drying Technol* 25, 2035-2045.
- Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., Morales, A.L., (2010). Microencapsulation by Spray-Drying of Anthocyanin Pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 6977-6985.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y., Zhao, G., (2013). Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. *LWT Food Science and Technology* 51, 348-355.
- Spada, J.C., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C., (2012). Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*. 89, 1166-1173.
- Thys, R.C.S., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Aires, A.G., Cladera-Olivera, F., (2010). Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. *Journal of Food Engineering*. 100, 468-473.
- Włodarczyk-Stasiak, M., Jamroz, J., (2008). Analysis of sorption properties of starch-protein extrudates with the use of water vapour. *Journal of Food Engineering*. 85, 580-589.

VIII. PERSPECTIVAS

- La presente investigación sugiere que la amilosa juega un papel importante en la conformación estructural de las microesferas y deben realizarse estudios posteriores para determinar qué relación amilosa/amilopectina es más efectivo en la encapsulación de compuestos de valor agregado
- En futuras investigaciones, se deben evaluar diferentes grados de sustitución para observar su influencia en la estabilidad de antocianinas.
- La luminiscencia emitida por las antocianinas en los espectros RAMAN impidió observar las vibraciones de las microesferas por lo tanto se debe seguir trabajando en ello.

IX. APÉNDICE.

IX.1 Mezclas de agentes encapsulantes para la microencapsulación de antocianinas de maíz

IX.2 Introducción

La técnica de microencapsulación es ampliamente utilizada en el desarrollo y la producción de alimentos y la mejora de sistemas de administración de fármacos. Esta técnica es utilizada para controlar los ingredientes activos liberados o mejorar la estabilidad de los ingredientes encapsulados. Como se mencionó anteriormente, el problema principal asociado con el almacenamiento de antocianinas es su inestabilidad y debido a ello, diferentes agentes encapsulantes han sido investigados para la protección de antocianinas para la mejora de su estabilidad.

Numerosos agentes de encapsulación como los carbohidratos, proteínas y lípidos disponibles para aplicaciones alimentarias han sido utilizados. Entre ellos la goma arábiga ha sido utilizada desde hace muchos años ya que es inocua, es inodora, insípida, es un excelente emulsificador y debido a que presenta baja viscosidad en solución acuosa es una excelente opción. En contraste, es difícil conseguir siempre la misma calidad de la goma y debido a ello se ha remplazado total ó parcialmente por materiales alternativos.

El uso de maltodextrinas como material de pared para encapsular antocianinas por secado por aspersión como la técnica de encapsulación es ampliamente utilizada (Ersus y Yurdagel 2007; Osorio *et al.* 2010). El uso de proteínas como material de pared es otra forma viable de microencapsular polifenoles, la proteína de suero de leche (WPI) y maltodextrinas se utilizó para encapsular extracto de arándano (Betz *et al.*, 2012). La combinación de maltodextrinas con goma arábiga ó proteína (zeína) mostró una mayor estabilidad y una menor velocidad de degradación en antocianinas (Burin *et al.*, 2011) y polifenoles microencapsulados (Davidov-Pardo *et al.*, 2012) de uva en comparación con un sólo material. La combinación de goma arábiga, almidón

modificado y maltodextrinas han sido utilizados para la microencapsulación de cardamon, comino y oleoresina de cúrcuma (Krishnan et al. 2005; Kanakdande et al. 2007; Kshirsagar et al. 2009; Krishnan *et al.*, 2005; Kanakdande *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo fue obtener una formulación óptima de agentes encapsulantes para microencapsular mediante secado por aspersión antocianinas de maíz negro utilizando un diseño experimental D-optimal diseñado por el usuario, mediante la mezcla de tres componentes: almidón succinatado, almidón acétilado y proteína de soya como agentes encapsulantes. Las microesferas fueron evaluadas por el contenido de antocianinas y la higroscopicidad.

IX.2.1 Materiales y métodos

Se utilizó el extracto de antocianinas obtenido de maíz negro (*Zea mays* L.) colectado de San Juan Ixtenco, Tlaxcala, Mex. Los almidones succinatado y acetilado de maíz con grado de sustitución 0.064 y 0.02. Se utilizó el aislado de proteína de soya de la marca DIPROSOY 90.

IX.2.2 Preparación de las microesferas mediante secado por aspersión

La mezcla de alimentación fue preparada mediante la disolución de los agentes encapsulantes en agua a 40 °C y se mezclaron con el extracto de antocianinas (1mg Cd-3-glu/g de almidón). Después, la mezcla se homogeneizó a 14.000 rpm durante 10 min (Ultra Turrax T- 25 -SI, IKA Works, EE.UU.). La microencapsulación se llevo a cabo mediante secado por aspersión en un Lab- Plant- SD Basic (LabPlant, Huddersfield, Reino Unido), con las siguientes condiciones de secado: temperatura del aire de entrada de 170 ± 2 °C; temperatura de salida del aire de 100 ± 5 °C; diámetro de la boquilla de 0,5 mm; y la tasa de flujo de líquido de 7.5 ml / min. El flujo de aire del equipo se estableció de aproximadamente $70 \text{ m}^3 / \text{h}$. Se preparó una dispersión de 20 g (db) de material de pared / 100 ml de agua destilada con un contenido de antocianinas de 1.12 mg / g.

IX.2.3 Eficiencia de encapsulación

Se calculó con la Ecuación VI.2.

IX.2.4 Higroscopicidad

La higroscopicidad fue determinada de acuerdo al método propuesto por Nijdam y Langrish (2006), con algunas modificaciones. Se pesaron muestras de 1 g de microesferas y se colocaron en un desecador que contenía una solución saturada de KCl (84.26 % RH) a 25 °C. Después de una semana las muestras fueron pesadas y la higroscopicidad fue expresada como: gramos de humedad absorbida por cada 100 g de microesferas en base seca (g/100 g).

IX.2.5 Análisis estadístico

La metodología de superficie de respuesta permite explorar la combinación de niveles de los factores que proporcionan una condición de operación del proceso ó producto óptima. Sin embargo, cuando en el experimento la respuesta depende del uso restringido de las proporciones de los ingredientes de la fórmula, diseños factoriales y metodología de superficie de respuesta factoriales no pueden adaptarse al problema, la solución se logra a través de una variante de los métodos de superficie de respuesta llamados teoría de diseño óptimo de experimentos (DOE).

Los agentes encapsulantes de las microesferas de antocianinas se mezclaron siguiendo las proporciones de un diseño óptimo de experimentos (D Optimal) diseñados por el usuario mediante el software Design -Expert 8 mostrado en el **Cuadro VIII. 1.**

Cuadro VIII. 1. Niveles de los factores utilizados en el diseño experimental.

Material de pared	Nivel
almidón succinatado	0-100 %
almidón acetilado	0-100 %
maltodextrinas	0-50 %
proteína	0-2 %

Las restricciones de frontera de los componentes de la mezcla se determinaron a partir de los datos disponibles en la literatura (Ying-Chang 2012, Burin *et al.*, 2011; Fang 2012), estableciendo el número y los intervalos de los componentes de la mezcla (**Cuadro VIII.1**). Las variables de respuesta evaluadas fueron la retención de antocianinas (RE) y la higroscopicidad (HI). Se llevaron a cabo 20 corridas experimentales (**Cuadro VIII.2**). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar la falta de ajuste y la importancia de los modelos.

Cuadro VIII. 2. Ensayos seleccionados mediante el modelo

M	NS	NA	MD	P
1	49.5	49.5	0	1
2	36.5	36.5	25	2
3	74	0	25	1
4	0	75	25	0
5	0	98	0	2
6	100	0	0	0
7	48	0	50	2
8	98	0	0	2
9	0	73	25	2
10	74	0	25	1
11	24	24	50	2
12	49.5	49.5	0	1
13	0	100	0	0
14	74	0	25	1
15	0	49	50	1
16	0	49	50	1
17	49.5	49.5	0	1
18	50	0	50	0
19	25	25	50	0
20	37.5	37.5	25	0

NS: normal succinatado, NA: normal acetilado, MD: maltodextrina, P: proteína.

IX.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

IX.3.1 Cambios en el perfil de antocianinas durante el secado por aspersión

Se muestran en las Figuras VIII. 1-11, el perfil de antocianinas de los extractos de las microesferas preparadas con los diferentes tratamientos. El perfil en todos los tratamientos es muy similar al del extracto, Fang y Bhandari (2011) también reportaron muy pocos cambios después del secado por aspersión de polifenoles. Se observaron sólo 12 picos. En el Cuadro VIII. 3, se encuentran las proporciones de cada pico. Se observan en mayor proporción las antocianinas cianidina-3-glucósido y cianidina-3-(6-di-malonyl glucósido), también se observó que la proporción de estas antocianinas se incrementó después del secado por aspersión. Al comparar las proporciones de ambas se observó que cianidina-3-glucósido se encontró en mayor proporción en las mezclas: 7, 15 y 16; y cianidina-3-(6 di malonyl glucósido) se encontró en mayor proporción en: 3, 4, 6, 12, 13, 18, 19, 21. Se ha repostado por varios autores que las antocianinas aciladas son más estables, (Cao *et al.*, 2009) reportaron que cianidina-3-glucósido fue menos estable que cianidina-3-(6 di malonil glucósido) en jugo de naranja rojo, después de un tratamiento térmico. Por lo tanto se especula que una mayor concentración de cianinida-3-glucósido se atribuye a un mayor efecto protector de los agentes encapsulantes. Se observó que la adición de aislado proteico de soya a mezclas de almidón succinatado y/o almidón acetilado, ayudó a incrementar la proporción de cianidina-3-glucósido; dicho efecto no fue observado cuando se utilizó maltodextrinas. Los perfiles de antocianinas de las mezclas 7, 15 y 16 presentaron proporciones muy similares de cada tipo de antocianina.

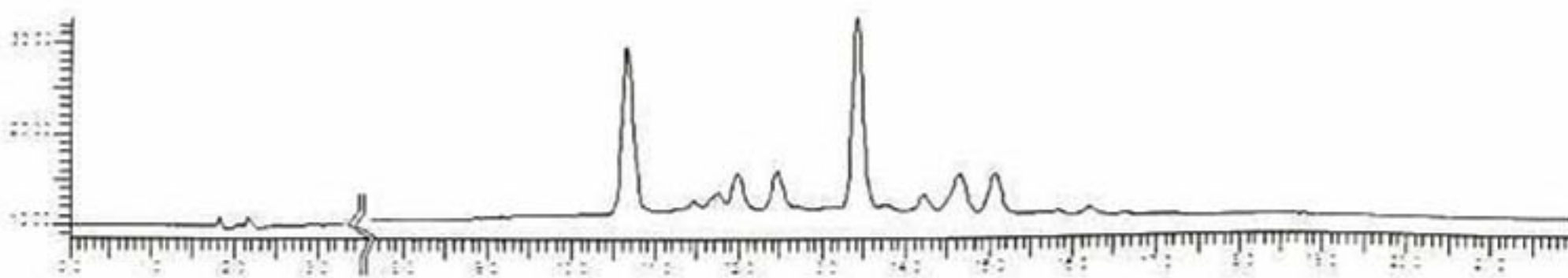


Figura VIII. 1. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M4 (AA75%:MD25%).

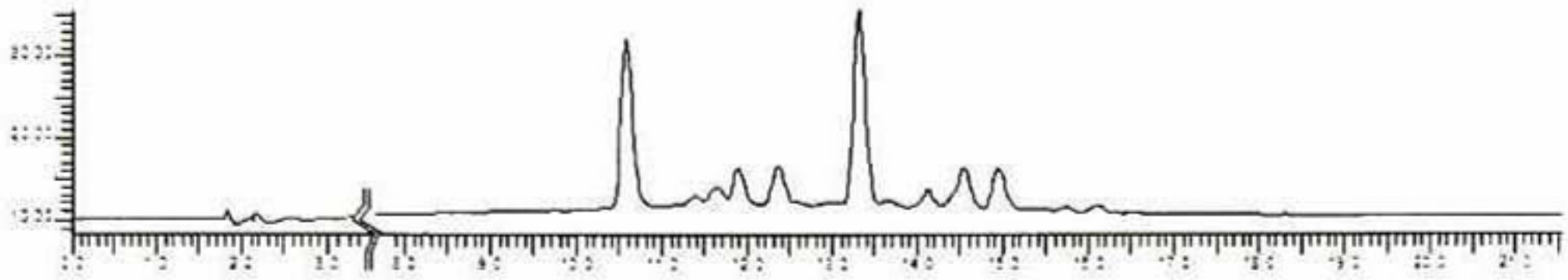


Figura VIII. 2. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M5(AS50%:MD50%).

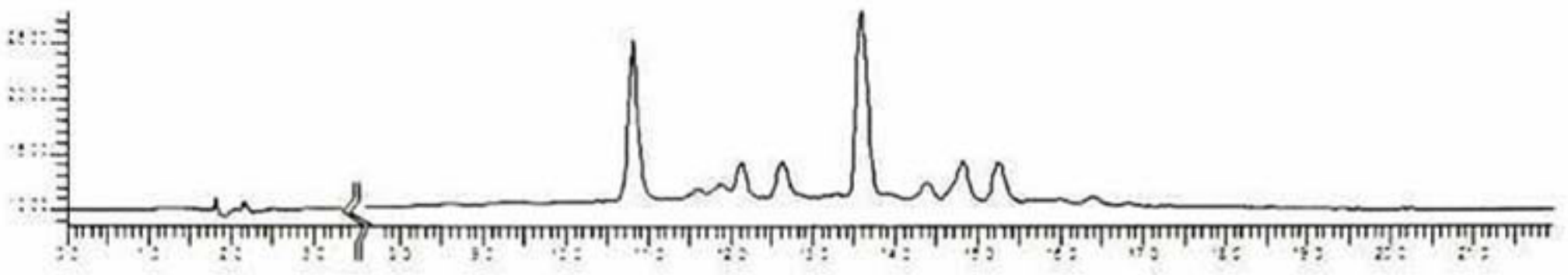


Figura VIII. 3. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M6 (AS50%:MD50%).

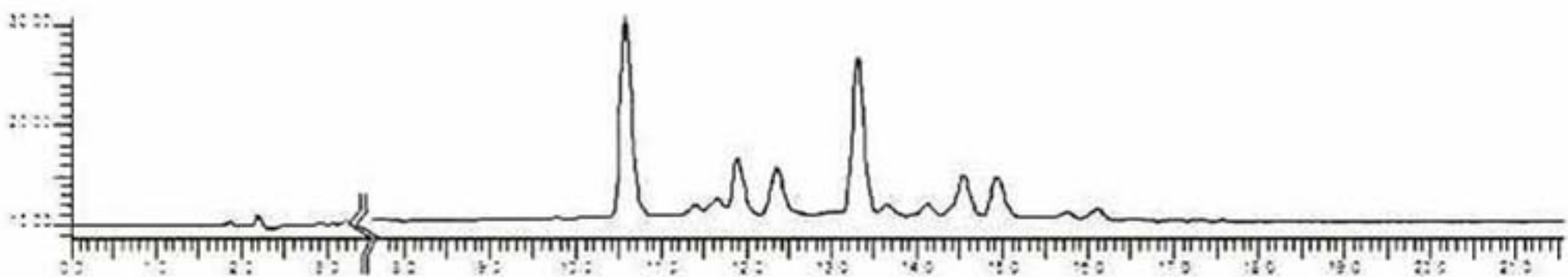


Figura VIII. 4. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M7 (AS49.5%:AA49.5%:P1%).

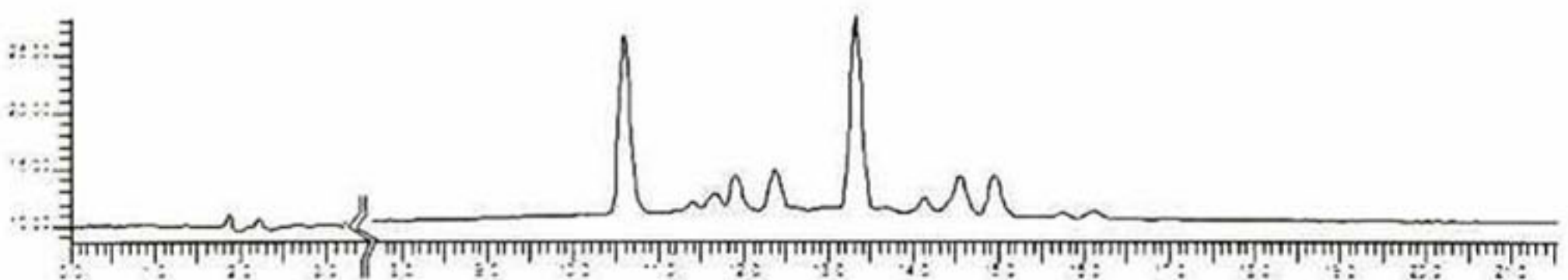


Figura VIII. 5. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M12 (AS74%:MD25%:P1%).

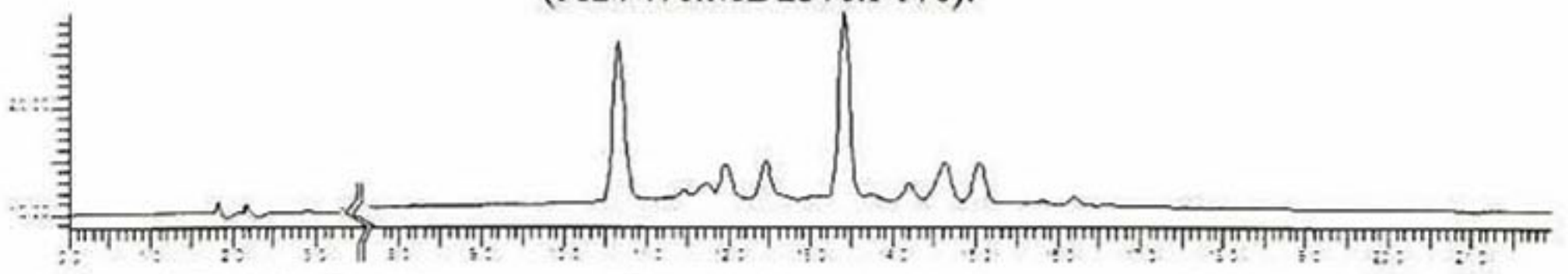


Figura VIII. 6. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M13 (AA49%:MD50%:P1%).

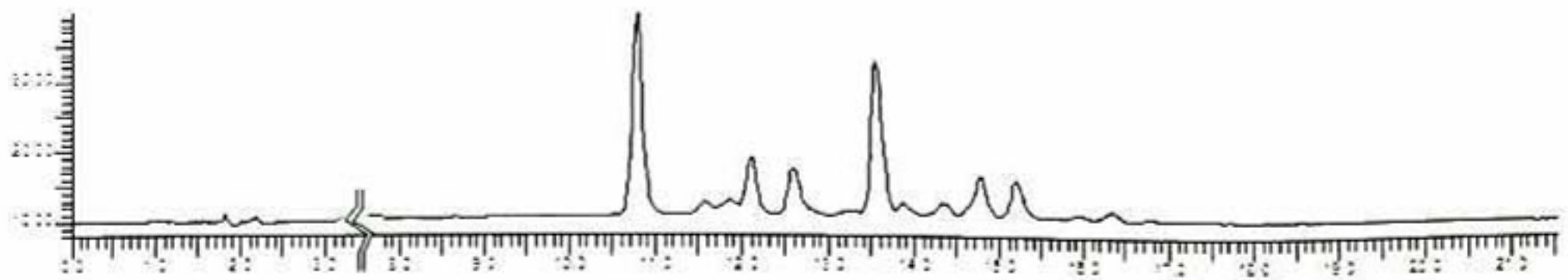


Figura VIII. 7. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M15 (AS98%:P2%)

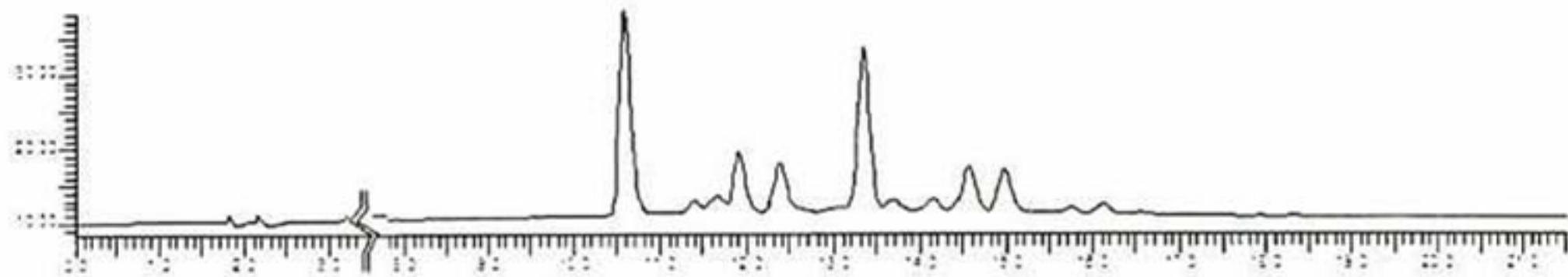


Figura VIII. 8. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M16 (AA98%:P2%)

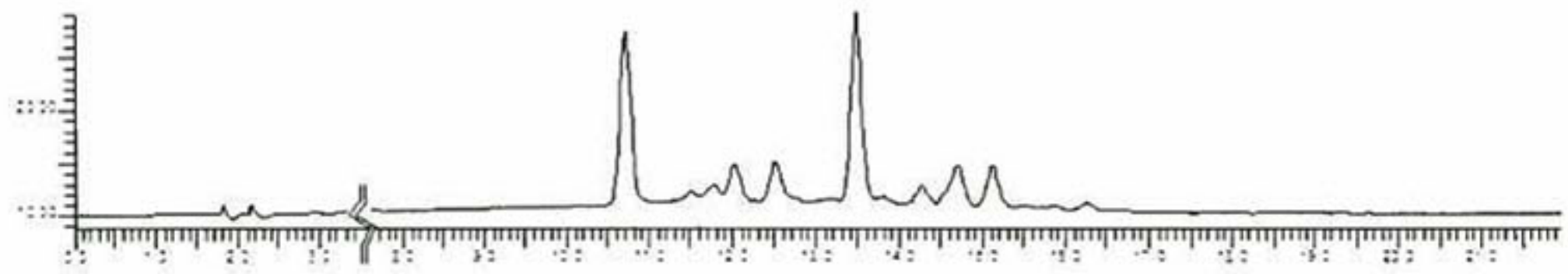


Figura VIII. 9. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M18 (AA73%:MD25%:P2%).

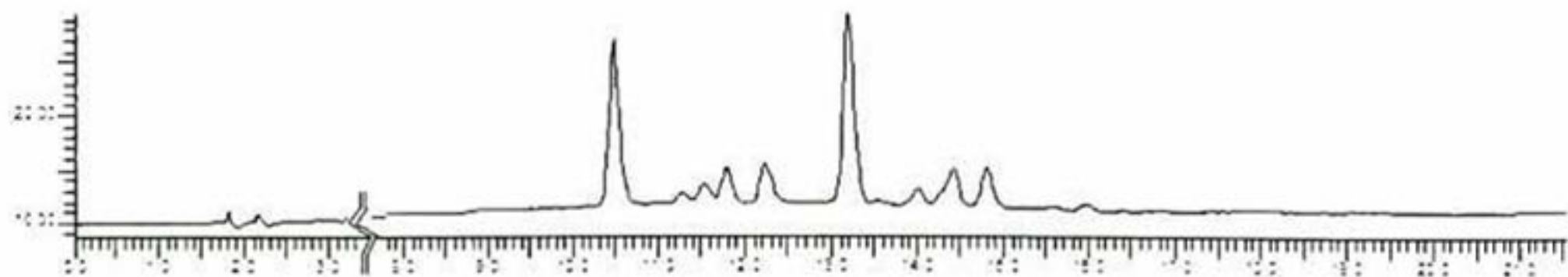


Figura VIII. 10. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M19 (AS48%:MD50%:P2%).

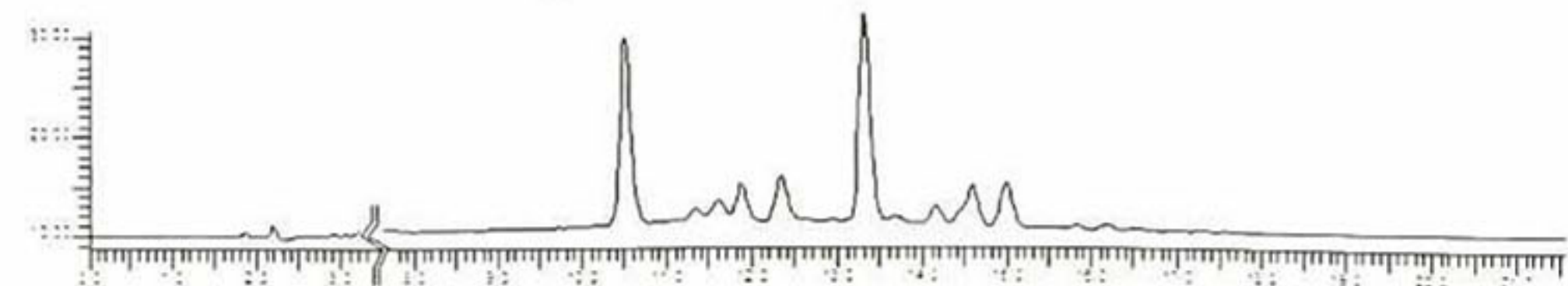


Figura VIII. 11. Perfil cromatográfico de las antocianinas encapsuladas con la M20 (AS37.5%:AA37.5%:MD25%).

IX.3.2 Evaluación del diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el diseño experimental IV-Optimal, con el fin de estudiar los efectos de la combinación de agentes encapsulantes (almidón succinatado, almidón acetilado, maltodextrinas DE 10 y aislado de proteína de soja) en la eficiencia de encapsulación y higroscopicidad. El **Cuadro VIII. 4**, muestra los 20 ensayos arrojados por el modelo y sus valores de respuesta experimentales.

Se observó que las eficiencias de encapsulación fueron satisfactorias para todos los tratamientos, ya que se encontraron entre 93.99 y 98.53 %, siendo la M2 (36.5A:36.5B:25C:2D) la que presentó el valor más alto y la M18 (37.5A:37.5B:25C) la que presentó el valor más bajo. Las eficiencias obtenidas fueron similares a las reportadas por Davidov-Pardo *et al.*, (2013) quienes reportaron valores de entre 96.8 y 98.7 % para mezclas de proteína de zeína con maltodextrinas ó goma de mezquite, en la encapsulación de polifenoles de uva.

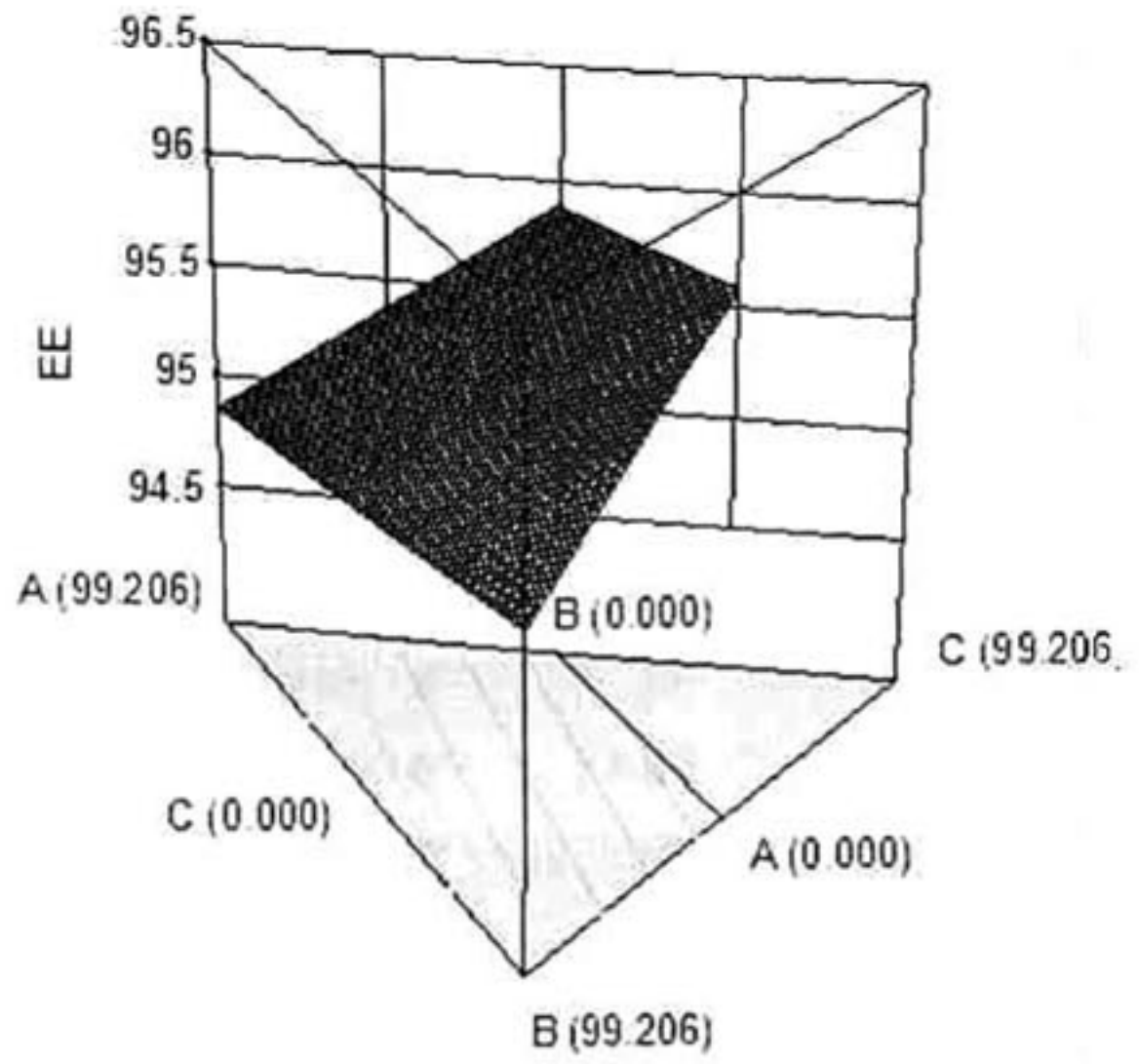
La higroscopicidad es un factor importante para la estabilidad de las microesferas de antocianinas, ésto es debido a que las antocianinas son susceptibles de degradarse a estructuras de coloración café (chalcona) mediante la hidratación de su estructura principal (catión flaviliun) (Brouillard y Delaporte, 1977). Los valores de higroscopicidad presentados en el **Cuadro VIII. 4**, estuvieron entre 16.66 y 23.17 para M6 (100 % A) y M7 (48 %A, 50 %C, 2 %D) respectivamente. Tonon *et al.*, (2008), reportó un valor más bajo de higroscopicidad (13.62 g/100g) para microesferas de açai preparadas con maltodextrinas, producidas en similares condiciones: a 170 °C de temperatura de entrada y 94 °C a la salida

Cuadro VIII. 4. Ensayos seleccionados mediante el modelo y sus respectivas variables de respuesta.

	A(AS)	B(AA)	C(MD)	D(P)	Y ₁	Y ₂
1	49.5	49.5	0	1	94.59	17.46
2	36.5	36.5	25	2	98.53	22.5
3	74	0	25	1	97.04	19.55
4	0	75	25	0	94.8	20.07
5	0	98	0	2	97.04	16.95
6	100	0	0	0	94.16	16.66
7	48	0	50	2	98.41	23.17
8	98	0	0	2	96.52	18.26
9	0	73	25	2	95.96	19.67
10	74	0	25	1	94.35	19.54
11	24	24	50	2	98.53	23.12
12	49.5	49.5	0	1	94.35	17.51
13	0	100	0	0	94.45	15.15
14	74	0	25	1	94.59	19.53
15	0	49	50	1	96.52	21.05
16	0	49	50	1	96.52	21.03
17	49.5	49.5	0	1	97.04	17.51
18	50	0	50	0	93.99	21.77
19	25	25	50	0	94.37	18.26
20	37.5	37.5	25	0	94.8	20.07

AS: almidón succinatado, AA: almidón acetilado, MD: maltodextrina, P: proteína, Y1: eficiencia de encapsulación; Y2: higroscopicidad.

Component Coding: Actual
 EE
 96.52
 93.89
 X1 = A: AS
 X2 = B: AA
 X3 = C: MD
 Actual Component
 D. P = 0.794



Higroscopicity
 23.17
 15.15
 X1 = A: AS
 X2 = B: AA
 X3 = C: MD
 Actual Component
 D. P = 0.794

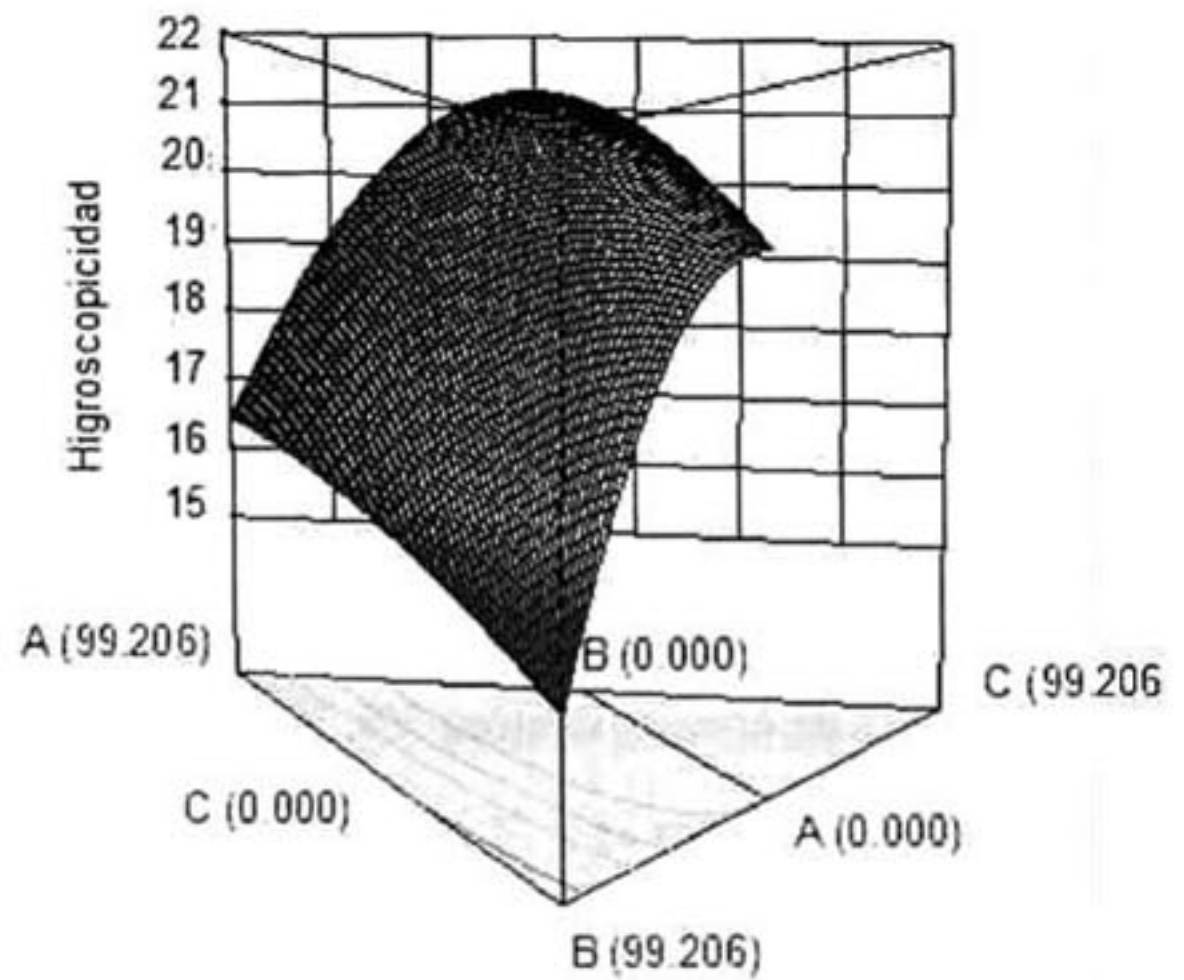


Figura VIII. 12. Grafico de superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación y la higroscopicidad

Mediante el uso de software de diseño de experimentos, los modelos se ajustaron a los resultados experimentales (**Cuadro VIII. 5**). Los resultados de las estadísticas del modelo mostraron que, los modelos lineal y especial cúbico presentaron los valores máximos de "R² ajustado" y los valores predichos de "R²" en EE y HI respectivamente. Las ecuaciones finales obtenidas en términos de los componentes reales se dan a continuación:

$$ME = 93.65*AS + 94.07*AA + 95.72*MD + 247.36*P$$

$$\begin{aligned} \text{Higroscopicidad} = & 16.66*AS + 15.15*AA - 15.97782496*MD + 8541.247084*P - \\ & 17.83961103*AS*AA + 85.71564993*AS*MD - 8616.925596*AS*P + \\ & 67.74376662*AA*MD - 8608.26233*AA*P - 4917.583685*MD*P + \\ & 7.326755305*AS*AA*MD + 2436.78948*AS*AA*P - 7570.054709*AS*MD*P - \\ & 5565.664217*AA*MD*P \end{aligned}$$

Los gráficos de superficie de respuesta se muestran en la **Figura VIII.12**, en donde se observa que la EE aumenta conforme se incrementó la concentración de maltodextrinas y por el contrario a menores concentraciones de maltodextrinas, la higroscopicidad disminuyó. La alta solubilidad de las maltodextrinas favorece la eficiencia de encapsulación, sin embargo es desfavorable utilizarla al 100 % porque es muy higroscópica.

IX.3.3 Análisis de varianza (ANOVA)

La tendencia a asegurar las mejores características de las microesferas después del secado por aspersión se destaca como uno de los objetivos más importantes de la tecnología de microencapsulación de antocianinas. Con el fin de investigar el ajuste y la significancia del modelo, un análisis de la varianza (ANOVA) se realizó utilizando el software de diseño de expertos. ANOVA también mostró los efectos de los parámetros individuales y la interacción de las variables en la EE y H de las mezclas. Los resultados del ANOVA se presentan en el **Cuadro VIII. 5**.

El valor "F" compara la variación de las diferencias en el promedio de las respuestas en los puntos del diseño experimental, y las correspondientes respuestas estimadas utilizando el modelo lineal, con la variación experimental esperada de acuerdo con las estimaciones de los puntos del diseño replicados (error puro). Los valores de los valores de F fueron de 10.85 y 14978.94 para EE y HI respectivamente, lo cual implica que los modelos son significativos. El análisis de varianza muestra que es significativo y la falta de ajuste no es significativa.

El p-valor (ó Prob> F) es la probabilidad de alcanzar el valor F. Un valor inferior a 0.05 indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias. Un valor mayor que 0.10 indica que no hay diferencia entre las medias (Baroutian *et al.*, 2010). Por lo tanto, los resultados muestran que los valores de p (probabilidad de valor de error) fueron de 0.0004 y 0.0001 para la Ee y HI, respectivamente, y se confirma que los modelos son significativos. Además, el análisis de varianza (ANOVA) muestra también, que los componentes de la mezcla en términos del modelo lineal son significativas debido a que sus valores de p son menores que 0.05 (Jeirani *et al.*, 2012).

Cuadro VIII. 5. ANOVA para la eficiencia de encapsulación y la higroscopicidad.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	G.L	Cuadrad Medios	Valor F	Prob > F	
Retención de antocianinas						
Linear	31.41	3	10.47	10.85	0.0004	significativo
Residuo	15.45	16	0.97			
Falta de Ajuste	6.58	11	0.60	0.34	0.9380	no
Error Puro	8.86	5	1.77			significativa
Var Total	46.86	19				
Higroscopicidad						
Modelo	80.49	13	6.19	14978.94	< 0.0001	significativo
Lineal	61.19	3	20.40	49344.53	< 0.0001	
AB	2.89	1	2.89	6980.57	< 0.0001	
AC	11.19	1	11.19	27080.85	< 0.0001	
AD	1.41	1	1.41	3418.12	< 0.0001	
BC	13.19	1	13.19	31922.37	< 0.0001	
BD	1.41	1	1.41	3410.04	< 0.0001	
CD	0.41	1	0.41	986.21	< 0.0001	
ABC	0.04	1	0.04	91.89	< 0.0002	
ABD	7.79	1	7.79	18850.91	< 0.0001	
ACD	7.17	1	7.17	17353.82	< 0.0001	
BCD	7.76	1	7.76	18765.05	< 0.0001	
Error Puro	0.00	5	0.00			
Var Total	80.49	18				

También se analizaron los datos para comprobar la normalidad de los residuales. La normalidad de la probabilidad se graficó contra los residuales, como se muestra en la **Figura VIII. 13**. Como se puede observar la dispersión de los puntos se encontró cerca de una línea recta.

El **Cuadro VIII. 6** muestra los valores de R^2 , R^2 - predicho y el coeficiente de variación (CV %), los cuales sirven para comprobar la adecuación de los modelos; R^2 -predicho mide la cantidad de variación en los nuevos datos, explicada mediante el modelo. Generalmente, un número más cercano a uno es el preferido. Un valor bajo de: “PRESS” y R^2 -predicho, en comparación con la R^2 -ajustada, implica que el modelo ajustado es adecuado para predecir (Prakash Maran *et al.*, 2013).

Los modelos ajustados para EE y HI fueron significativos. Los modelos arrojaron coeficientes de determinación (R^2) de 0.670 para EE, 1 para HI, y para R^2 -ajustada valores de 0.6085 para EE, 0.999 para HI, los cuales son altos y adecuados a una alta correlación entre los valores observados y predichos.

Cuadro VIII. 6. Resumen estadístico del modelo

Modelo	Std. Dev.	R^2	Ajustada R-	Prediccha R-	PRESS	Observación
Y₁						
Lineal	0.9826	0.6703	0.6085	0.5339	21.8442	Sugerida
Cuadrático	1.1212	0.7318	0.4903	-0.7989	84.3017	
EspecialCubic	1.2835	0.7891	0.3321	-45.6754	2187.3090	
Cúbico	1.3315	0.8108	0.2812		+	Error
Y₂						
Lineal	1.1344	0.7602	0.7122	0.6122	31.2106	Sugerida
Cuadrático	1.1062	0.8632	0.7263	0.3142	55.1997	
EspecialCubic	0.0203	1.0000	0.9999		+	Sugerida
Cúbico					+	Error

+ Caso(s) con un aprovechamiento de 1.0000: PRESS estadístico no definido

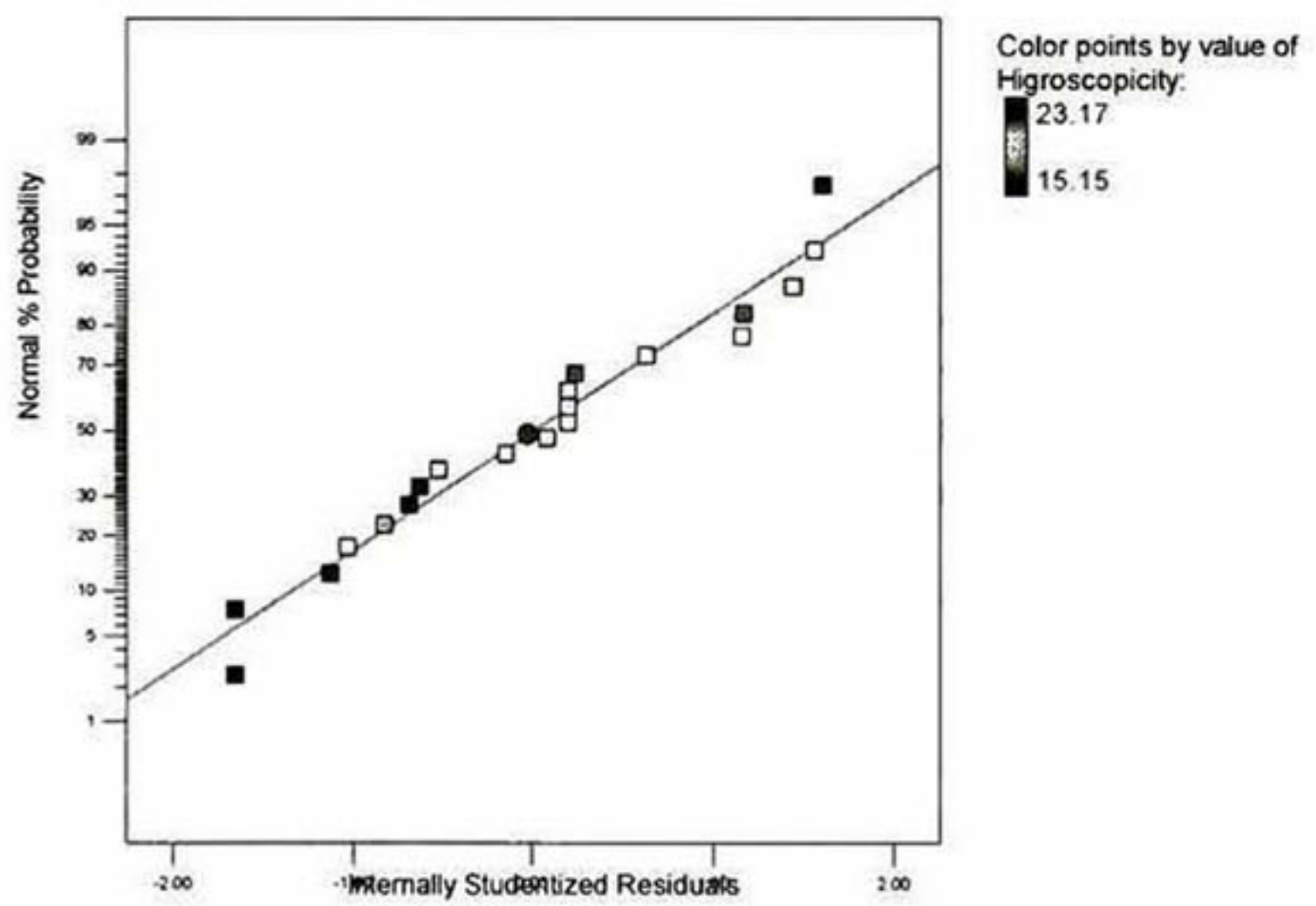
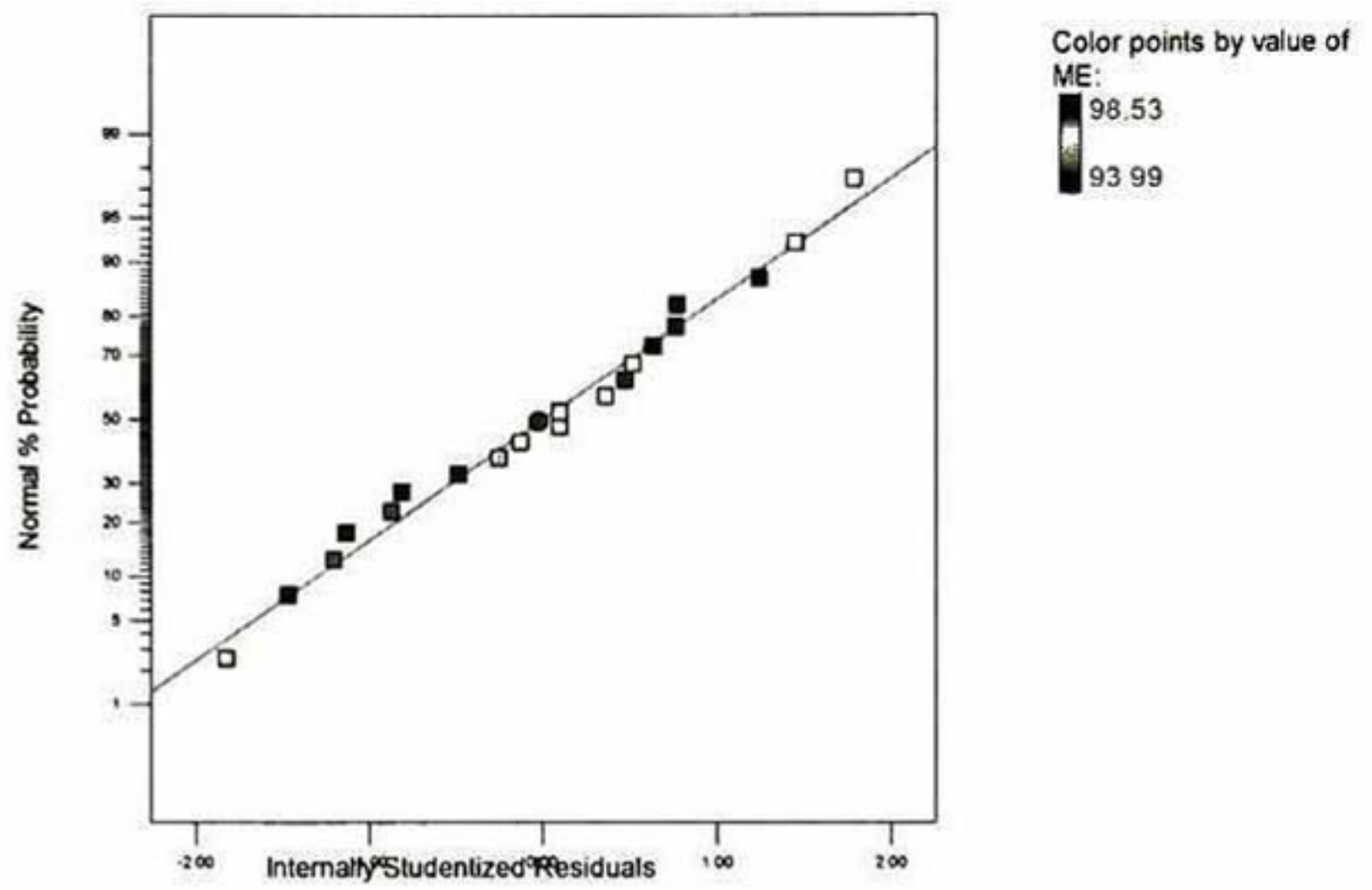


Figura VIII. 13. Gráficas de probabilidad normal para la eficiencia de encapsulación y la higroscopicidad.

Conclusiones

- La adición de aislado proteico de soya a mezclas de almidón succinatado y/o almidón acetilado, ayudó a incrementar la proporción de cianidina-3-glucósido.
- El análisis de varianza demostró que los modelos: lineal y cúbico ajustados a las variables de respuesta, eficiencia de encapsulación e hidrosopicidad, así como sus parámetros fueron significativos.
- Por lo tanto un diseño experimental de mezclas de agentes encapsulantes puede ser utilizada como una herramienta alternativa para la optimización de agentes encapsulantes.

IX.4 Referencias

- Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K., Richling, E., Kulozik, U., (2012). Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Research International* 47, 51-57.
- Brouillard, R., Delaporte, B., (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*. 99, 8461-8468.
- Burin, V.M., Rossa, P.N., Ferreira-Lima, N.E., Hillmann, M.C.R., Boirdignon-Luiz, M.T., (2011). Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science Technology* 46, 186-193.
- Dao, S., Liu, L., Pan, S., Lu, Q., Xu, X., (2009). A Comparison of Two Determination Methods for Studying Degradation Kinetics of the Major Anthocyanins from Blood Orange. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 245-249.
- Cuevas Montilla, E.F., Hillebrand, S.F., Antezana, A.F., Winterhalter, P., 2006. Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry JID* 0374755 .
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., Marín-Arroyo, M., (2013). Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. *Food and Bioprocess Technology* 6, 941-951.
- Davidov-Pardo, G., Moreno, M.F., Arozarena I., Marín-Arroyo, M.R., Bleibaum, R.N., Bruhn, C.M., (2012). Sensory and consumer perception of

- the addition of grape seed extracts in cookies. *Journal of food science JID* 0014052 .
- Ersus, S., Yurdagel, U., (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. 80, 805-812.
- Jeirani, Z., Mohamed Jan, B., Si Ali, B., Mohd. Noor, I., Chun Hwa, S., Saphanuchart, W., (2012). The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemometrics Intellig. Lab. Syst.* 112, 1-7.
- Kanakdande, D., Bhosale, R., Singhal, R.S., (2007). Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers*. 67, 536-541. Krishnan, S., Kshirsagar, A.C., Singhal, R.S., 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*. 62, 309-315.
- Kshirsagar, A.C., Singhal, R.S., (2008). Preparation of hydroxypropyl corn and amaranth starch hydrolyzate and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Food Chemistry*. 108, 958-964.
- Kshirsagar, A.C., Yenge, V., Sa kar, A., Zamre, M., Singhal, R.S., (2010). Evaluation of microencapsulated turmeric oleoresin for pre-extrusion coloring using response surface methodology. *J. Food Process. Preserv.* 34, 302-315.
- Nijdam, J.J., Langrish, T.A.G., (2006). The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering*. 77, 919-925.
- Osorio, C., Forero, D.P., Carriazo, J.G., (2011). Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. *Food Research International* 44, 1174-1181.
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Sridhar, R., Prince Immanuel, V., (2013). Development of model for mechanical properties of tapioca starch based edible films. *Industrial Crops and Products* 42, 159-168.
- Zhao, X., Zhang, C., Guigas, C., Ma, Y., Corrales, M., Tauscher, B., Hu, X., (2009). Composition, antimicrobial activity, and antiproliferative capacity anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays* L.) from China. *Eur Food Res Technol* 228:759–765.

X. ANEXO

X.1 Publicaciones

- García-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y., & Martínez-Bustos, F. 2014. Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. 2014. *Food and Bioproducts Processing*, (In Press) doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.10.003>
- García-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y., & Martínez-Bustos. Preparation and evaluation of succinylated starches as encapsulating agents for anthocyanins by spray-drying. *Carbohydrate Polymers* (Artículo por enviar).
- García-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y., Hernández-Rodríguez, A. & Martínez-Bustos. Preparation of phosphorylated maize starch as encapsulating agents for anthocyanins microencapsulation. *Journal of cereal chemistry* (Artículo por enviar).

X.2 Participaciones en congresos

- García-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y., & Martínez-Bustos. Berlin, Germany, 28-30 Agosto, 2013. Optimization of wall material mixtures for anthocyanins microencapsulation by spray-dry. XXI International Conference on Bioencapsulation (Poster).
- García-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y., Trápaga-Martínez, G. & Martínez-Bustos. Pamplona Spain, 9-11 Septiembre, 2013. Maize starch derivatives as wall materials for purple maize anthocyanins using spray drying. 19th International Symposium on Microencapsulation (Poster).

EL JURADO DESIGNADO POR LA UNIDAD QUERÉTARO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APROBÓ LA TESIS DOCTORAL DE LA C. YUNIA VERÓNICA GARCÍA TEJEDA TITULADA: "ENCAPSULACIÓN DE ANTOCIANINAS DE MAÍZ PIGMENTADO USANDO ALMIDONES MODIFICADOS COMO MATERIAL DE PARED", FIRMAN AL CALCE DE COMÚN ACUERDO LOS INTEGRANTES DE DICHO JURADO, EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO, QRO., A LOS DIECIOCHO DÍAS DEL MES DE MAYO DE 2015.



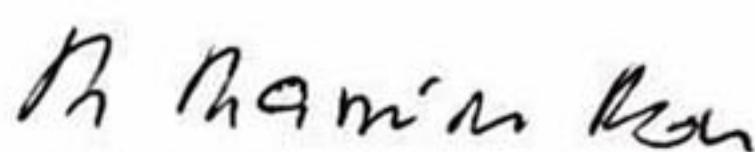
DR. FERNANDO MARTÍNEZ BUSTOS



DR. SERGIO JOAQUÍN JIMÉNEZ SANDOVAL



DR. JUAN FRANCISCO PÉREZ ROBLES



DR. RAFAEL RAMÍREZ BON



DR. PEDRO ALBERTO VÁZQUEZ LANDAVERDE



CINVESTAV - IPN
Biblioteca Central



SSIT0012980