

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**ESTABILIDAD DE BETALAÍNAS (BETACIANINAS Y BETAXANTINAS)
ENCAPSULADAS EN EMULSIONES OBTENIDAS CON
SURFACTANTES NATURALES Y MÉTODOS DE ALTA ENERGÍA.**

POR:

I.Q. ARLET CALVA QUINTANA

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

JUNIO DE 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 16 de julio de 2021.
Oficio: 75/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P r e s e n t e:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“Estabilidad de betalainas (betacianinas y betaxantinas) encapsuladas en emulsiones obtenidas con surfactantes naturales y métodos de alta energía”**, presentada por la estudiante **Arlet Calva Quintana**, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
“Por la ciencia para bien del hombre”

Dr. Armando Quintero Ramos
Asesor de tesis

Dra. Carmen Oralía Meléndez Pizarro
Asesora de tesis

Dr. Francisco Paraguay Delgado
Asesor de tesis

Dra. Martha Graciela Ruiz Guitérrez
Directora de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

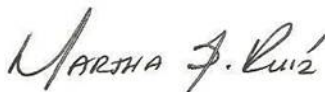
Chihuahua, Chih. A 20 de mayo del 2021

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad De Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Me permito hacer de su conocimiento que la tesis "**Estabilidad de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) encapsuladas en emulsiones obtenidas con surfactantes naturales y métodos de alta energía**" presentada por la estudiante **I.Q. Arlet Calva Quintana**, con número de matrícula 282279, para la obtención del grado de **Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, ha sido revisada y liberada para su presentación y revisión por parte del Comité de tesis.

Sin otro particular por el momento agradezco de antemano las atenciones brindadas a la presente.

A T E N T A M E N T E



D. C. Martha Graciela Ruiz Gutiérrez
Director del proyecto de tesis
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, que es mi alma máter y proporcionó instalaciones y apoyo para el desarrollo de este proyecto, así como a los maestros que contribuyeron con sus conocimientos y su entrega a mi formación profesional.

∞

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por su apoyo a través de la beca mediante la cual pude permanecer el programa de posgrado.

∞

A mi directora de tesis, la Dra. Martha Graciela Ruiz Gutiérrez, así como a los asesores de este proyecto: Dr. Armando Quintero Ramos, Dra. Carmen Oralía Meléndez Pizarro y Dr. Francisco Paraguay Delgado. Por su tiempo y apoyo en el desarrollo y la revisión de este proyecto de tesis.

∞

A la Dra. América Chávez Martínez y a Juliana de la Facultad de Zootecnia por su apoyo y disposición para la liofilización de las muestras. Así como a la Dra. Blanca Sánchez de la Facultad de Ciencias Químicas por su guía y soporte con el uso del microscopio.

∞

Al Dr. David Neder por sus comentarios, enseñanzas y apoyo durante todo el proyecto.

∞

A mi familia y amigos por acompañarme en el proceso, que a veces sin saber de lo que les estaba hablando, se interesaban por ayudarme y aprender junto conmigo.



ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE DE CONTENIDO	II
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	4
II. ANTECEDENTES	6
2.1 BETALAÍNAS.....	7
2.1.1 BETACIANINAS Y BETAXANTINAS.....	8
2.2 GARAMBULLO.	11
2.3 ENCAPSULACIÓN.....	12
2.4 EMULSIÓN.	14
2.4.1 MÉTODOS DE HOMOGENIZACIÓN.	16
2.4.2 EMULSIFICANTE.....	17
2.4.3 TIPOS DE EMULSIFICANTES	19
2.5 SAPONINAS.	22
III. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	24
IV. HIPÓTESIS	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 MATERIAL EXPERIMENTAL.	25



5.2 PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA.	25
5.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE EMULSIONES.	26
5.3.1 FASE 1: EMULSIONES SIMPLES (W/O) CON DIFERENTES SURFACTANTES.	28
5.3.1.1 CÁLCULO DE INTENSIDAD DE ULTRASONIDO.	28
5.3.1.2 CÁLCULO DE VALOR DE HLB.	29
5.3.1.3 EVALUACIÓN DE SURFACTANTES EN EMULSIONES SIMPLES (W/O).	29
5.3.2 FASE 2: EFECTO DE POTENCIA Y TIEMPO DE SONICACIÓN EN EMULSIONES SIMPLES (W/O).30	
5.3.3 FASE 3: PREPARACIÓN DE EMULSIONES DOBLES (W/O/W).	30
5.3.3.1 OPTIMIZACIÓN Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL.	31
5.3.4 FASE 4: EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD DE EMULSIÓN DOBLE A DIFERENTES CONDICIONES.	31
5.3.4.1 INFLUENCIA DE PH.	31
5.3.4.2 INFLUENCIA DE FUERZA IÓNICA.	31
5.3.4.3 INFLUENCIA DE TEMPERATURA.	32
5.3.5 FASE 5: EVALUACIÓN FISCOQUÍMICA DE EMULSIONES DOBLES.	32
5.3.6 FASE 6: EMULSIONES DOBLES CON EXTRACTO DE BETACIANINA Y BETAXANTINA. 32	
5.4 MÉTODOS FISCOQUÍMICOS.	33
5.4.1 BETALAÍNAS.	33
5.4.1.1 EXTRACCIÓN PARA DETERMINACIÓN DE BETALAÍNAS.	33
5.4.1.2 SEPARACIÓN DE LAS BETALAÍNAS.	35
5.4.1.3 CUANTIFICACIÓN DE BETALAÍNAS TOTALES.	35
5.4.1.4 IDENTIFICACIÓN DE BETALAÍNAS ESPECÍFICAS, POR HPLC.	36
5.4.4 AZÚCARES REDUCTORES.	37
5.4.6 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN.	38
5.4.7 ÍNDICE DE CREMADO.	39
5.4.8 MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE GOTA.	39
5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS.	40
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43



6.1	CARACTERIZACIÓN DE MATERIA PRIMA.....	43
6.2	INTENSIDAD DE ULTRASONIDO.....	46
6.3	EMULSIONES SIMPLES CON DIFERENTES SURFACTANTES.....	47
6.3.1	MORFOLOGÍA DE GOTA EN LA EMULSIÓN.....	47
6.3.2	TAMAÑO DE GOTA.....	50
6.3.3	ESTABILIDAD DE EMULSIONES.....	55
6.3.4	EVALUACIÓN DE COLOR.....	59
6.4	EFFECTO DE LA POTENCIA Y TIEMPO DE SONICACIÓN EN EMULSIONES SIMPLES.....	60
6.4.1	MORFOLOGÍA DE GOTA.....	61
6.4.2	TAMAÑO DE GOTA, ÍNDICE DE CREMADO Y PARÁMETROS DE COLOR.....	63
6.5	EVALUACIÓN DE EMULSIONES DOBLES (W/O/W).....	71
6.5.1	MORFOLOGÍA DE GOTA.....	72
6.5.2	TAMAÑO DE GOTA, ÍNDICE DE CREMADO Y EVALUACIÓN DE COLOR EN EMULSIONES DOBLES.....	76
6.5.3	OPTIMIZACIÓN DE EMULSIONES DOBLES.....	88
6.5.3.1	VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL DE LA OPTIMIZACIÓN.....	89
6.6	EVALUACIÓN DE EMULSIONES DOBLES A DIFERENTES CONDICIONES.....	90
6.6.1	TEMPERATURA.....	90
6.6.1	PH.....	95
6.6.2	INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA.....	98
6.7	EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA DE EMULSIONES DOBLES.....	101
6.8	SEPARACIÓN DE BETALAÍNAS Y ELABORACIÓN DE EMULSIONES DOBLES.....	107
6.8.1	EMULSIONES DOBLES CON EXTRACTO DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS.....	114
VII.	CONCLUSIONES.....	117
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
IX.	APÉNDICES.....	135
9.1	CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	135
9.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	136

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DISEÑO 2 ^K UTILIZANDO AMPLITUD Y TIEMPO COMO FACTORES.	40
TABLA 2. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO EN EMULSIONES DOBLES.....	41
TABLA 3. ANÁLISIS PROXIMAL EN BASE HÚMEDA DE GARAMBULLO.....	43
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL GARAMBULLO.....	45
TABLA 5. POTENCIA E INTENSIDAD DE ULTRASONIDO A DIFERENTES AMPLITUDES.	47
TABLA 6. TAMAÑO DE GOTA EN EMULSIONES CON DIFERENTES SURFACTANTES.....	54
TABLA 7. PARÁMETROS DE COLOR EN EMULSIONES ELABORADAS CON DIFERENTES SURFACTANTES.	59
TABLA 8. ANÁLISIS DE VARIANZA (SUMA DE CUADRADOS) PARA EL TAMAÑO DE GOTA, ÍNDICE DE CREMADO Y LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LAS MUESTRAS DE EMULSIONES SIMPLES.	65
TABLA 9. EVALUACIÓN DE COLOR EN EMULSIONES SIMPLES DIA 0/DIA 7.	71
TABLA 10. ANÁLISIS DE VARIANZA (SUMA DE CUADRADOS) PARA EL TAMAÑO DE GOTA, ÍNDICE DE CREMADO Y LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LAS MUESTRAS DE EMULSIONES DOBLES.	78
TABLA 11. TAMAÑO DE GOTA, ÍNDICE DE CREMADO Y PARÁMETRO A* DE COLOR EN EMULSIONES DOBLES.	90
TABLA 12. TAMAÑO DE GOTA EN EMULSIONES SIMPLES Y DOBLES CON EXTRACTOS DE GARAMBULLO.	102
TABLA 13. PARÁMETROS DE COLOR EN EMULSIONES SIMPLES Y DOBLES CON EXTRACTOS DE GARAMBULLO.	103
TABLA 14. CONTENIDO DE BETALAÍNAS EN EXTRACTOS Y MUESTRAS DE EMULSIONES DOBLES.	104
TABLA 15. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN EMULSIONES DOBLES CON EXTRACTO DE GARAMBULLO.	105
TABLA 16. CONTENIDO DE BETALAINAS EN EXTRACTO DE BETABEL Y GARAMBULLO.....	111
TABLA 17. EVALUACIÓN DE EMULSIONES DOBLES CON BETACIANINAS Y BETAXANTINAS.	116



TABLA 18. ANÁLISIS DE T-PAREADA PARA PARÁMETROS DE COLOR EN EMULSIONES SIMPLES CON DIFERENTES SURFACTANTES.....	136
TABLA 19. ANÁLISIS DE T-PAREADA PARA PARÁMETROS DE COLOR EN EMULSIONES SIMPLES A DIFERENTES CONDICIONES.....	137
TABLA 20. ANÁLISIS DE T-PAREADA PARA DIÁMETRO DE PARTÍCULA EN EMULSIONES DOBLES.	137
TABLA 21. ANÁLISIS DE T-PAREADA PARA PARÁMETROS DE COLOR EN EMULSIONES SIMPLES Y DOBLES CON EXTRACTOS DE GARAMBULLO.....	137
TABLA 22. ANÁLISIS DE T-PAREADA EN CONTENIDO DE BETALÁINAS EN EXTRACTOS Y MUESTRAS DE EMULSIONES DOBLES.	138
<i>TABLA 23. ANÁLISIS DE T-PAREADA EN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN EMULSIONES DOBLES CON EXTRACTO DE GARAMBULLO.....</i>	<i>138</i>
<i>TABLA 24. ANÁLISIS DE T-PAREADA PARA EVALUACIÓN DE EMULSIONES CON BETACIANINAS Y BETAXANTINAS.....</i>	<i>139</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA GENERAL DE LAS BETALAÍNAS (FENNEMA, 2008).....	7
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS (HERBACH ET AL., 2006).....	9
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA LECITINA (FOSFATIDILCOLINA) (SHAH ET AL., 2018).....	20
FIGURA 4. ESTRUCTURA TENSOACTIVOS SPAN (BARTELDTS ET AL., 2018).....	21
FIGURA 5. ESTRUCTURA TENSOACTIVOS TWEEN 80 Y TWEEN 40 (STOYANOVA ET AL., 2016).	21
FIGURA 6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE EMULSIONES.....	27
FIGURA 7. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE GARAMBULLO Y BETABEL.	34
FIGURA 8. GARAMBULLO CONGELADO.....	43
FIGURA 9. GRÁFICO DE CINÉTICA DE ULTRASONIDO EN DIFERENTES AMPLITUDES.	46
FIGURA 10. MORFOLOGÍA DE GOTA PARA MUESTRAS CON SPAN 80, TWEEN 40, TWEEN 80, LECITINA Y MEZCLAS (SP= SPAN 80, TW40= TWEEN 40, TW80= TWEEN 80, L= LECITINA). MICROSCOPIA 60X, DILUCIÓN 1:10.	49
FIGURA 11. DISTRIBUCIÓN REPRESENTATIVA DEL TAMAÑO DE LAS GOTAS EN EMULSIONES PREPARADAS CON DIFERENTES EMULSIFICANTES.....	52
FIGURA 12. SEPARACIÓN EN EMULSIONES CON DIFERENTES SURFACTANTES (2H-25°C). A) MUESTRAS A 4°C DESPUÉS DE 24H, B) SPAN 80, C) TWEEN 40, D) SPAN 80: TWEEN40, E) LECITINA, F) SPAN 80: LECITINA, G) TWEEN 80, H) SPAN 80: TWEEN 80.	55
FIGURA 13. RESULTADOS DE ÍNDICE DE CREMADO (%) PARA EMULSIONES CON DIFERENTES EMULSIFICANTES.....	57
FIGURA 14. COLOR EN MUESTRAS DE EMULSIONES A) SPAN 80, B) TWEEN 40, C) SPAN 80: TWEEN 40, D) TWEEN 80, E) SPAN 80: TWEEN 80, F) LECITINA, G) SPAN 80: LECITINA.	60
FIGURA 15. MORFOLOGÍA DE GOTA DE EMULSIONES SIMPLES ELABORADAS CON DIFERENTES TIEMPOS (1, 2 Y 3 MIN) E INTENSIDAD DE ULTRASONIDO (30%: 935 W/L, 50%: 1700 W/L Y 70%: 2695 W/L). MICROSCOPIA 60X, DILUCIÓN 1:10.	62

FIGURA 16. GRÁFICO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA DIÁMETRO DE GOTA DE EMULSIONES SIMPLES.	64
FIGURA 17. GRÁFICO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA ÍNDICE DE CREMADO DE EMULSIONES SIMPLES.	66
FIGURA 18. GRÁFICO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA PARÁMETRO L^* DE EMULSIONES SIMPLES.....	67
FIGURA 19. GRÁFICO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA PARÁMETRO A^* DE EMULSIONES SIMPLES.....	68
FIGURA 20. GRÁFICO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA PARÁMETRO B^* DE EMULSIONES SIMPLES.....	69
FIGURA 21. GRÁFICO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA PARÁMETROS DE COLOR AL DÍA 7. A) PARÁMETRO L^*_7 , B) PARÁMETRO A^*_7 , C) PARÁMETRO B^*_7	70
FIGURA 22. MORFOLOGÍA DE GOTA 60 X, DILUCIÓN 1:100 PARA EMULSIONES DOBLES CON DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE EMULSIFICANTE, TIEMPO Y AMPLITUD DE SONICACIÓN. A= AMPLITUD, T= TIEMPO, C= CONCENTRACIÓN DE EMULSIFICANTE.	73
FIGURA 23. SUPERFICIE DE RESPUESTA DE TAMAÑO DE GOTA EN EMULSIONES DOBLES. A) CONCENTRACIÓN DE QUILLAJA VS. AMPLITUD; B) TIEMPO VS. CONCENTRACIÓN DE QUILLAJA ; C) AMPLITUD VS. TIEMPO.	79
FIGURA 24. ÍNDICE DE CREMADO EN EMULSIONES DOBLES (DIA 7). AMPLITUD, CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA), TIEMPO: A) 50%, 0.5%, 2 MIN, B) 30%, 0.7%, 3MIN, C) 50%, 0.5%, 2MIN, D) 70%, 0.7%, 1MIN, E) 30%, 0.3%, 1MIN.....	80
FIGURA 25. SUPERFICIE DE RESPUESTA DEL ÍNDICE DE CREMADO (IC) (DÍA 1) EN EMULSIONES DOBLES. A) CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA) VS. AMPLITUD; B) CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA) VS. TIEMPO; C) AMPLITUD VS. TIEMPO.	82
FIGURA 26. SUPERFICIE DE RESPUESTA DEL ÍNDICE DE CREMADO (DÍA 7) EN EMULSIONES DOBLES. A) CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA) VS. AMPLITUD; B) TIEMPO VS. CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA); C) AMPLITUD VS. TIEMPO.	83
FIGURA 27. SUPERFICIE DE RESPUESTA (AMPLITUD VS. CONCENTRACIÓN QUILLAJA SAPONARIA) DEL PARÁMETRO L^* (DÍA 0) EN EMULSIONES DOBLES.....	84

FIGURA 28. SUPERFICIE DE RESPUESTA DEL PARÁMETRO DE COLOR A* (DÍA 0 Y 7) EN EMULSIONES DOBLES. A), B) CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA) VS. AMPLITUD; C), D) CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA) VS. TIEMPO; E), F) AMPLITUD VS. TIEMPO. 86

FIGURA 29. SUPERFICIE DE RESPUESTA DEL PARÁMETRO DE COLOR B* (DÍA 0 Y 7) EN EMULSIONES DOBLES. A), B) CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA) VS. AMPLITUD; B) CONCENTRACIÓN (QUILLAJA SAPONARIA) VS. TIEMPO; C) AMPLITUD VS. TIEMPO. 87

FIGURA 30. GRÁFICA DE OPTIMIZACIÓN PARA EMULSIONES DOBLES (MINITAB STATISTICAL SOFTWARE, 2013). IC= ÍNDICE DE CREMADO (%), TP= TAMAÑO DE GOTA (μM)..... 88

FIGURA 31. MORFOLOGÍA DE GOTA 60-100X, DILUCIÓN 1:100 PARA EMULSIONES DOBLES CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA. 91

FIGURA 32. EFECTOS DE LA TEMPERATURA EN EMULSIONES DOBLES. A) DIÁMETRO, B) ÍNDICE DE CREMADO, C) L*, D) A*, E) B* 94

FIGURA 33. MORFOLOGÍA DE GOTA 100X, DILUCIÓN 1:100 PARA EMULSIONES DOBLES CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE PH. 96

FIGURA 34. EFECTOS DEL PH EN EMULSIONES DOBLES. A) DIÁMETRO, B) ÍNDICE DE CREMADO, C) L*, D) A*, E) B*. MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR (N=3). LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (P<0.05), MEDIANTE PRUEBA DE TUKEY. 97

FIGURA 35. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN EN EMULSIONES DOBLES. A) ÍNDICE DE CREMADO, B) A* 99

FIGURA 36. MORFOLOGÍA DE GOTA 100X, DILUCIÓN 1:100 PARA EMULSIONES DOBLES, MUESTRA CONTROL (A) Y MUESTRA TRATADA CON SOLUCION DE NaCl (B)..... 100

FIGURA 37. EMULSIONES SIMPLES (A,B) Y DOBLES (C,D) ELABORADAS CON EXTRACTO SIMPLE (A,C) Y CONCENTRADO (B,D) DE GARAMBULLO. 101

FIGURA 38. BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE EXTRACTO DE BETABEL..... 107

FIGURA 39. BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE EXTRACTO DE GARAMBULLO. 108

FIGURA 40. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE GARAMBULLO 536 NM. 1) BETANINA, 2) ISOBETANINA, 3) BETANIDINA, 5) ISOBETANIDINA. 109

FIGURA 41. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE GARAMBULLO 481 NM. 1) INDICAXANTINA, 2) BETANINA, 3) ISOBETANINA, 4) BETANIDINA, 5) ISOBETANIDINA. 109

FIGURA 42. CROMATOGRAMA DE ESTÁNDAR DE BETANINA (2500 PPM) 536 NM. 1) BETANINA, 2) ISOBETANINA.	110
FIGURA 43. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE BETABEL 538 NM. 1) BETANINA, 2) BETANIDINA.	110
FIGURA 44. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE BETABEL 480 NM. 1) BETANINA, 2) BETANIDINA, 3) INDICAXANTINA.....	110
FIGURA 45. SEPARACIÓN DE FASES DE EXTRACTO DE BETABEL.....	112
FIGURA 46. BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA BETACIANINAS.	112
FIGURA 47. BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA BETAXANTINAS.	113
FIGURA 48. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE BETACIANINAS 536 NM. 1) BETANINA, 2) ISOBETANINA.	113
FIGURA 49. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE BETACIANINAS 481 NM. 2) BETANINA, 3) ISOBETANINA.	113
FIGURA 50. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE BETAXANTINAS 536 NM. 1) BETANINA, 2) ISOBETANINA.	114
FIGURA 51. CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE BETAXANTINAS 481 NM. 1) INDICAXANTINA, 2) BETANINA.....	114
FIGURA 52. MORFOLOGÍA DE GOTA DE EMULSIONES DOBLES CON EXTRACTO DE BETACIANINAS (A,B) Y BETAXANTINAS (C,D).....	115
FIGURA 53. EMULSIONES DOBLES CON A) BETACIANINAS Y B) BETAXANTINAS.	116
FIGURA 55. CURVA DE CALIBRACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	135
FIGURA 56. CURVA DE CALIBRACIÓN AZÚCARES REDUCTORES.....	135
FIGURA 57. CURVA DE CALIBRACIÓN POLIFENOLES TOTALES.	136



LISTA DE ABREVIATURAS

Símbolo	Significado
A	Amplitud
b.h	Base húmeda
b.s	Base seca
Bc	Betacianina
Bx	Betaxantinas
C	Concentración
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ET	Equivalente de trolox
g	Gramos
Glu	Glucosa
h	Horas
HLB	Balance hidrofílico lipofílico
I	Intensidad de sonicación
J	Joules
Kg	Kilogramos
L	Litros
Log	Logaritmo
μ	Micro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
μm	Micrómetro



μL	Microlitro
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
t	tiempo
W/L	Watts/Litro
W/O	Agua/Aceite
W/O/W	Agua/Aceite/Agua
x g	Fuerza Centrífuga



RESUMEN

El garambullo es una fuente de betalaínas, pigmentos antioxidantes de interés en la industria de alimentos. El uso de tecnologías como la encapsulación por emulsión es una alternativa que puede llegar a mejorar la vida de anaquel de estos compuestos bioactivos. La estabilidad de las emulsiones depende de factores como temperatura, emulsificante, concentración, tiempo e intensidad de sonicación. El objetivo de este proyecto fue la evaluación de la estabilidad de betalaínas en emulsiones simples (W/O) y dobles (W/O/W) utilizando homogenización y sonicación, sumado al uso de saponinas como emulsificante. El extracto de garambullo fue caracterizado y liofilizado para posteriormente utilizarlo en la elaboración de emulsiones. Las emulsiones simples se formularon con aceite de coco y canola como fase oleosa, extracto de garambullo como fase acuosa y los emulsificantes evaluados fueron: Span 80, Tween 40, Span 80:Tween 40, Tween 80, Span 80:Tween 80, lecitina y Span 80:Lecitina. Posteriormente, para determinar las condiciones de procesamiento se utilizaron amplitudes de sonicación de 30, 50 y 70%, durante 1,3 y 5 min. Se seleccionó la emulsión más estable para utilizarla en emulsiones dobles, que estaban formuladas con 40% de emulsión simple, buffer de fosfatos (pH 5.8) y quillaja saponaria como emulsificante. Mediante un análisis de optimización se determinó la amplitud, el tiempo y la concentración de quillaja saponaria, para obtener la mayor estabilidad respecto a la separación de fases y los parámetros de color. Estas emulsiones fueron evaluadas fisicoquímicamente en almacenamiento y posteriormente en diferentes cambios de pH, temperatura y fuerza iónica. Por último, para evaluar el porcentaje de encapsulación de betacianinas y betaxantinas se realizó una separación de extracto de betabel para su análisis en HPLC y su posterior aplicación en emulsiones dobles. Los resultados arrojaron que para emulsiones simples, la mezcla Span 80:Tween 40 (70:30), tratada durante 1 min a 30% de amplitud de sonicación, presentó los mejores resultados de morfología, tamaño de gota ($\approx 1.85 \mu\text{m}$), índice de cremado y estabilidad de color. Mediante el análisis de optimización y la verificación del modelo, se obtuvo que para las emulsiones dobles con una amplitud de 73% durante 2.24 min y 0.16% de quillaja saponaria, se lograron emulsiones estables con un diámetro de gota de $0.8 \mu\text{m}$, sin



separación de fases y estabilidad de los parámetros de color. En almacenamiento se logró una eficiencia de encapsulación de betalaínas hasta del 83%, evitando la degradación de la actividad antioxidante hasta 7 días después de la elaboración. Los factores de procesamiento como pH y temperatura siguen teniendo influencia significativa en la estabilidad de las betalaínas, sin embargo, el uso de encapsulación por emulsión permite tener una liberación controlada, en la que se pueden alcanzar temperaturas hasta de 60°C con una retención de a^* del 90%. Y en el caso de las betaxantinas, la encapsulación por emulsión se presenta como una buena alternativa para mejorar su estabilidad en almacenamiento, teniendo una retención del 82% a 7 días de almacenamiento.

Palabras clave: Encapsulación, emulsión, betalaínas.

ABSTRACT

Garambullo is a source of betalains, antioxidant pigments of interest in the food industry. The use of technologies such as emulsion encapsulation is an alternative that can improve the shelf life of these bioactive compounds. The stability of the emulsions depends on factors such as temperature, emulsifier, concentration, time and intensity of sonication. The objective of this project was the evaluation of the stability of betalains in simple (W / O) and double (W / O / W) emulsions using homogenization and sonication, in addition to the use of saponins as emulsifier. The garambullo extract was characterized and lyophilized for later use in the production of emulsions. The simple emulsions were formulated with coconut and canola oil as the oily phase, garambullo extract as the aqueous phase, and the emulsifiers evaluated were: Span 80, Tween 40, Span 80: Tween 40, Tween 80, Span 80: Tween 80, Lecithin and Span 80: Lecithin. Subsequently, to determine the processing conditions, sonication amplitudes of 30, 50 and 70% were used for 1.3 and 5 min. The most stable emulsion was selected to be used in double emulsions, which were formulated with 40% simple emulsion,



phosphate buffer (pH 5.8) and quillaja saponaria as emulsifier. Through an optimization analysis, the amplitude, time and concentration of quillaja saponaria were determined, to obtain the highest stability with respect to phase separation and color parameters. These emulsions were evaluated physicochemically in storage and later in different changes of pH, temperature and ionic strength. Finally, to evaluate the encapsulation percentage of betacyanins and betaxanthins, a separation of beet extract was carried out for its analysis in HPLC and its subsequent application in double emulsions. The results showed that for simple emulsions, the Span 80: Tween 40 (70:30) mixture, treated for 1 min at 30% amplitude of sonication, presented the best results of morphology, droplet size ($\approx 1.85 \mu\text{m}$), index cremation and color stability. Through the optimization analysis and the verification of the model, it was obtained that for the double emulsions with an amplitude of 73% during 2.24 min and 0.16% of quillaja saponaria, the most stable emulsions were achieved with a drop diameter of $0.8 \mu\text{m}$, without phase separation and stability of color parameters. In storage, a betalain encapsulation efficiency of up to 83% was achieved, avoiding the degradation of antioxidant activity up to 7 days after processing. Processing factors such as pH and temperature continue to have a significant influence on the stability of betalains, however, the use of emulsion encapsulation allows to have a controlled release, in which temperatures up to 60°C can be reached with a retention of a * 90%. And in the case of betaxanthines, encapsulation by emulsion is presented as a good alternative to improve their storage stability, having a retention of 82% after 7 days of storage.

Keywords: Encapsulation, emulsion, betalains.



I. INTRODUCCIÓN

Existe una clara tendencia de los consumidores a elegir alimentos que fueron elaborados con ingredientes naturales u orgánicos debido a que son saludables y funcionales, sin embargo, el uso de este tipo de ingredientes es un reto para productores y desarrolladores de alimentos. Entre los ingredientes más utilizados en el procesamiento de alimentos se encuentran los colorantes, debido a que el color es una propiedad sensorial que atrae al consumidor y que puede ser causa de aceptación o rechazo de un alimento (León *et al.*, 2006). Una práctica común es el uso de colorantes sintéticos ya que proporcionan colores estables durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, sin embargo recientemente los colorantes sintéticos han sido relacionados con la incidencia a ciertas enfermedades, tales como indigestión, anemia, reacciones alérgicas como asma y urticaria, lesiones patológicas en el cerebro, tumores, cáncer, parálisis, retraso mental, anomalías en descendientes, retraso del crecimiento y defectos oculares que resultan en ceguera (El-Wahab *et al.*, 2012). Los colorantes naturales tienen alta pigmentación y funcionalidad, pero la inestabilidad que estos presentan ante las condiciones de procesamiento, así como sus propiedades de solubilidad pueden obstaculizar su uso. Se han reportado muy pocos estudios sobre la encapsulación por emulsión de betalaínas, pigmentos naturales hidrosolubles derivados del ácido betalámico. La encapsulación de estos se ha realizado en extractos que contienen dos tipos de betalaínas combinadas: las betacianinas (pigmentos rojo-púrpura) y las betaxantinas (pigmentos amarillo-naranja), sin embargo, además del color también hay una diferencia en la estabilidad y la estructura de estos compuestos, siendo alteradas por factores como la presencia de luz, oxígeno, metales pesados, agentes oxidantes o reductores, temperatura, actividad de agua y pH (Badui, 2013). Una encapsulación exitosa implica una buena emulsión y al mismo tiempo se busca utilizar componentes naturales para beneficio del consumidor. Actualmente se estudian nanoemulsiones que involucran la incorporación, absorción o dispersión, de componentes bioactivos en pequeñas gotas con diámetro nano. Estas nanogotas encapsuladas en la interfase de gotas de



emulsión, pueden mejorar la estabilidad y ser utilizadas como transportadores comestibles para componentes de sabor-aroma o color. Existen emulsionantes naturales como biosurfactantes, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos, que son capaces de formar emulsiones de agua en aceite estables en un rango de condiciones ambientales y, por lo tanto, pueden ser adecuadas para su uso en productos alimenticios comerciales. Sin embargo, deben estudiarse sus características para lograr emulsiones con un tamaño de gota adecuado que permitan la mejor estabilidad y protección de los compuestos bioactivos (McClements y Gumus, 2016). Dentro de la búsqueda de colorantes naturales y funcionales se encuentran las betalaínas presentes en el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Existen tecnologías como la encapsulación, específicamente en emulsiones, a través de las cuales se puede mejorar su estabilidad y aplicación industrial. Se propone el uso de emulsionantes naturales como las saponinas para estabilizar tanto la emulsión como los compuestos encapsulados, aprovechando la funcionalidad de las mismas. Además del uso de emulsionantes, se ha demostrado que la aplicación de métodos de alta energía para la elaboración de emulsiones mejora sus propiedades y su estabilidad. Los métodos de alta energía que se pretende utilizar son la homogenización y la sonicación, debido a que ambos son métodos no tóxicos, seguros y amigables con el ambiente. Las ventajas del ultrasonido incluyen un menor consumo de energía, la producción de una emulsión más homogénea, con un tamaño de gota más pequeño y una emulsión más estable, por lo que es una buena alternativa en el desarrollo de emulsiones (Iqbal *et al.*, 2014).

II. ANTECEDENTES

El color de la superficie de los alimentos es el primer parámetro de calidad evaluado por los consumidores y es usado como herramienta para aceptar o rechazar alimentos (León *et al.*, 2006). Dentro de la industria alimentaria prevenir los cambios no deseados que ocurren en los pigmentos, responsables del color de los alimentos, es ordinariamente difícil o imposible. Dependiendo del pigmento, su estabilidad se verá alterada por factores como la presencia de luz, oxígeno, metales pesados, agentes oxidantes o reductores, la temperatura, la actividad de agua y el pH. Debido a la inestabilidad de los pigmentos a veces se añaden colorantes a los alimentos. Un colorante es una sustancia utilizada como aditivo en un alimento para recuperar el color, perdido tras un procesamiento industrial, para acentuar el color original o para dotarle de un color más atractivo. Los colorantes pueden ser naturales, si son extraídos de una sustancia vegetal, animal o mineral, o sintéticos, si son productos modificados química o físicamente (Badui, 2013). Los colorantes sintéticos son ampliamente utilizados debido a sus propiedades colorantes, uniformidad, estabilidad y bajo costo, sin embargo, deben poseer ciertas características básicas a fin de prevenir riesgos para la salud de los consumidores y garantizar su utilidad. En un estudio realizado por la Universidad de Southampton se evaluó el efecto de la mezcla de seis colorantes sintéticos con benzoato sódico, usado frecuentemente como conservador en bebidas refrescantes y en otros productos consumidos por niños. El resultado concluyó que la hiperactividad infantil se podría ver exacerbada por el uso de esta mezcla (McCann *et al.*, 2007; Carmona, 2013). Con el aumento de este tipo de estudios, los pigmentos sintéticos son rechazados cada vez más por el consumidor, mientras que la aceptación de alternativas naturales o derivadas de la naturaleza es promovida por ser saludables y de buena calidad. Dentro de los pigmentos naturales que se han estudiado, los más comunes son carotenoides, clorofilas, antocianinas y betalaínas (Stintzing y Carle, 2004).

2.1 Betalaínas.

Las betalaínas son un grupo de pigmentos que contienen betacianinas (rojas) y betaxantinas (amarillas). La fórmula general de las betalaínas representa la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico, son pigmentos naturales hidrosolubles con nitrógeno en su estructura (Figura 1) que se sintetizan a partir del aminoácido tirosina (García *et al.*, 2012).

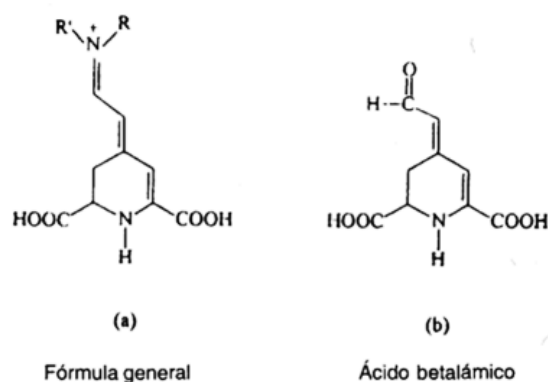


Figura 1. Estructura general de las betalaínas (Fennema, 2008).

Los frutos que contienen betalaínas también poseen fenoles de diferentes tipos, excepto antocianinas, pues estas dos clases de pigmentos son mutuamente excluyentes (Wu *et al.*, 2005). Las betalaínas además de dar coloración a los frutos que las contienen, son reconocidas por las importantes actividades biológicas que poseen; actividad antioxidante, antiinflamatoria, hepatoprotectora y anticancerígena (García *et al.*, 2016).

La familia más prometedora entre las plantas portadoras de betalaínas es la Cactaceae y los principales géneros que producen frutos comestibles son *Opuntia*, *Hylocereus* y algunas especies de *Mamillaria*. Entre ellos, tunas (género *Opuntia*) y pitayas (los géneros *Cereus*, *Hylocereus* y *Selenicereus*) se cultivan más comúnmente como

cultivos frutales y son más adecuados para ser investigados como fuentes de betalaínas para colorear alimentos (Stintzing y Carle, 2004).

La estabilidad de las betalaínas está afectada por el pH (muestran la mayor estabilidad en el rango de pH 4–6), la actividad del agua, la exposición a la luz, el oxígeno, la temperatura (mayor estabilidad a 4 °C) y las actividades enzimáticas. La temperatura es el factor más decisivo para la descomposición de las betalaínas (Castellar *et al.*, 2003; Herbach *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos pigmentos podrían usarse como colorantes en alimentos congelados, productos lácteos de baja temperatura y alimentos de vida útil corta (Herbach *et al.*, 2006). Sin embargo, las betalaínas presentan diferencias estructurales que las subdividen en betacianinas y betaxantinas, dándoles también características distintas.

2.1.1 Betacianinas y betaxantinas.

Las betalaínas se dividen en dos subclases: betacianinas y betaxantinas, estas presentan diferencias estructurales tal como se muestra en la Figura 2. Las betalaínas, que varían de betacianinas rojas/violetas a betaxantinas amarillas, muestran una diversidad de color debido a la acilación y la glicosilación (Akbar *et al.*, 2018). La estructura química de estos pigmentos se deriva del ácido betalámico y, dependiendo de los componentes unidos a la estructura principal, surgen betacianinas o betaxantinas, las primeras cuando el grupo es 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), que puede o no estar glicosilada y las betaxantinas si los compañeros de conjugación son aminoácidos o aminas derivadas (Figura 2) (Castellar *et al.*, 2003).

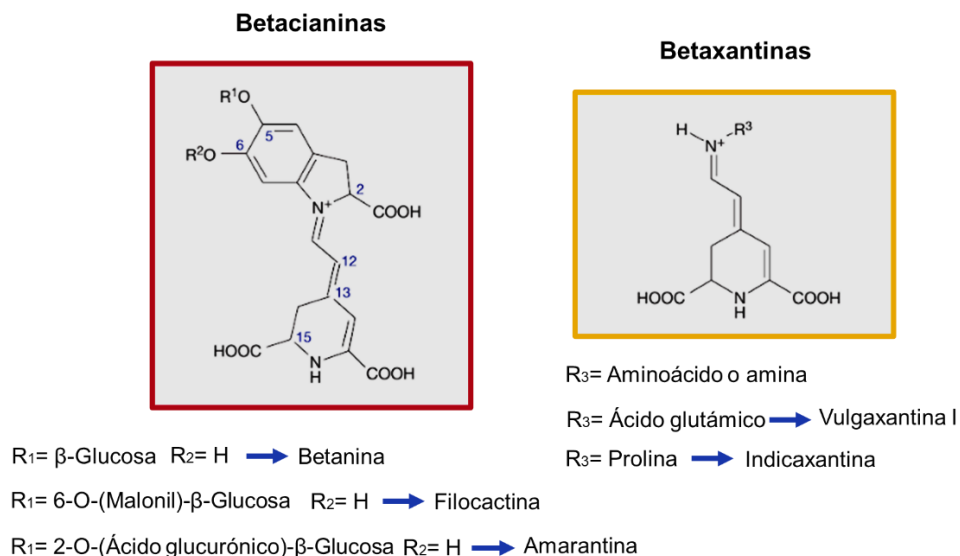


Figura 2. Estructura de betacianinas y betaxantinas (Herbach *et al.*, 2006).

Las betacianinas tienen un tono violeta profundo debido a su excepcional estructura aromática a λ_{max} 534-554 nm que muestra un desplazamiento batocromático de 60-70 nm en comparación con las betaxantinas. La estructura de betacianina varía debido al grupo acilo y, además, a los restos de azúcar. La betanidina es la aglicona de la mayoría de las betacianinas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Por glicosilación con uno o dos monosacáridos, así como la acilación de los 5-O- o 6-O-glucósidos resultantes, es posible una gran variedad de estructuras de betacianina. Las betacianinas se dividen en cuatro grupos que son gomprenina (6-O-glucosilado), descarboxybetanina, betanina (betanidina 5-O-β-glucósido), y amarantina. Siendo la betanina de las más estudiadas por ser la más abundante en la remolacha roja (Herbach *et al.*, 2006).

En las betaxantinas los sustituyentes R₂ (Figura 2) pueden ser un grupo amino o aminoácido y usualmente el R₁ es un hidrógeno, por ejemplo, en la vulgaxantina-I, R₂ es un residuo derivado del ácido glutámico y en la indicaxantina, R₁ y R₂ forman un grupo prolina (Herbach *et al.*, 2006). Esta condensación del ácido betalámico con compuestos amino (betaxantinas) o ciclo-Dopa (betacianinas) da como resultado una estabilidad diferente de las estructuras pigmentarias. Aunque las betalainas exhiben

una estabilidad de pH amplia que varía de pH 3 a 7 (Stintzing y Carle, 2004), se informó que el pH óptimo para la estabilidad de la betanina oscila entre pH 4 y 6 (Vaillant *et al.*, 2005). Además, en presencia de oxígeno, la betanina es más estable entre pH 5.5 y 5.8, mientras que en condiciones anaeróbicas, los valores de pH más bajos de 4.0 a 5.0 son favorables (Herbach *et al.*, 2006; Huang y von Elbe, 1987). Curiosamente, las betaxantinas mostraron estabilidad a valores de pH ligeramente aumentados que oscilaron entre 4 y 7 (Cai *et al.*, 2001), mientras que la mayor estabilidad de betaxantina a pH 5.5 correspondió al pH óptimo respectivo de betacianinas (Savolainen y Kuusi, 1978).

La temperatura es el factor más importante en la estabilidad de la betalaína durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. Algunos estudios informaron un aumento en las tasas de degradación de betalaína como resultado del aumento de la temperatura (Azeredo, 2008). Las betacianinas son susceptibles a degradación a temperaturas mayores a 50 °C, se observó que 30 % del pigmento se pierde a temperaturas de 85 °C (Woo *et al.*, 2011). Sin embargo, las pérdidas de betacianina en el jugo de pitaya acidificado a pH 4 es inferior al 10% durante la pasteurización a 80 °C durante 5 minutos (Vaillant *et al.*, 2005). En cuanto a los aspectos estructurales, se ha informado que las betacianinas son más estables que las betaxantinas a temperatura ambiente, así como luego del calentamiento (Herbach *et al.*, 2006; Sapers y Hornstein, 1979). Comparando la estabilidad de diferentes betacianinas en calentamiento se evidenció que las estructuras glicosiladas son más estables que las agliconas debido a que los azúcares unidos a la aglicona protegen a la molécula de la hidratación, evitando así su degradación (von Elbe y Attoe, 1985). Además, algunos estudios han indicado que la estabilidad de la betacianina se debe a la presencia de ácidos alifáticos o aromáticos especialmente en la posición 6-O de la estructura, eso debido a que permiten la formación de estructuras tipo sandwich que protegen del ataque del agua (Herbach *et al.*, 2006; von Elbe y Attoe, 1985).

2.2 Garambullo.

El garambullo, cuyo nombre científico es *Myrtillocactus geometrizans*, es una cactácea del reino Plantae, la cual requiere menos agua que la mayoría de los cactus. Este fruto tiene forma globular, con un promedio de 1.5 cm de diámetro y 1.2 cm de altura, y generalmente de color púrpura intenso cuando madura (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010). Su cultivo se realiza en áreas silvestres del centro de México y generalmente no se considera adecuada para actividades agrícolas ya que crece bien sin manejo agronómico formal. Se reporta como prevalente en las regiones áridas y semiáridas de los estados de Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí, y en áreas altamente restringidas de los estados de Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala (Hernández-López *et al.*, 2008).

La investigación más reciente sobre las propiedades fisicoquímicas del garambullo se centra en las betalaínas. Se ha demostrado que las betalaínas tienen importantes propiedades antioxidantes. Existe evidencia que sugiere que las frutas ricas en antioxidantes que se consumen comúnmente son beneficiosas para la salud debido a su capacidad para prevenir enfermedades crónicas. El efecto beneficioso se atribuye a compuestos antioxidantes como los fenólicos, la vitamina C, entre otros no nutrientes (Herrera-Hernández *et al.*, 2011). El garambullo contiene un 99% de betacianinas y un 1% de betaxantinas, en comparación con las frutas comúnmente consumidas, tiene un mayor poder antioxidante (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010; García-Barrera *et al.*, 1998). No obstante, en México estas frutas son a menudo subutilizadas o consumidas en áreas rurales. Por lo tanto, el creciente interés por los nuevos alimentos hace que sea relevante evaluar el potencial comercial de esta fruta que merece más atención con respecto a su composición química para procesarla en productos de alto valor agregado (Hernández-López *et al.*, 2008).

En la temporada de producción (de junio a septiembre), los frutos se encuentran en todos los mercados públicos en los estados donde se cultivan. Por lo general, las frutas se consumen frescas o en forma procesada, como helados, mermeladas y, más raramente, en pasas secas al sol (Hernández-López *et al.*, 2008). Una de las

principales limitaciones del garambullo es la corta vida postcosecha, ya que, si se recolecta en la madurez para su consumo y se mantiene a temperatura de 22 °C en recipientes cerrados, en menos de seis horas fermenta de forma rápida. Sin embargo, si el fruto se almacena en recipientes abiertos, a los dos días se observa una invasión fúngica. Por otra parte, si se mantiene en congelación (-2°C) al descongelarse se presentan daños físicos y una disminución de aroma y sabor (García-Barrera *et al.*, 1998). La industria requiere de tecnologías que protejan los pigmentos naturales del ambiente, debido a su inestabilidad en la presencia de luz, aire, humedad, altas temperaturas y pH del medio. Actualmente, una alternativa es la tecnología de microencapsulación, la cual permite aislar ingredientes para que no puedan interactuar con otros componentes alimentarios y evitar su degradación, así como mantener el pH del medio para mayor estabilidad de sus componentes (Parra-Huertas, 2010).

2.3 Encapsulación

La encapsulación o microencapsulación se define como una tecnología de envasado de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en cápsulas miniatura que se encuentran selladas, pudiendo liberar su contenido a velocidades controladas en condiciones específicas. La técnica de microencapsulación se puede emplear para retener propiedades de un alimento durante el procesamiento y almacenamiento, mejorando el sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos, y de esa manera proteger sustancias sensibles al ambiente (Lee, 2003). Este tipo de técnicas mejora la vida útil de los colorantes naturales como las betalaínas, aumentando su estabilidad. Una microcápsula consiste en una membrana semipermeable, esférica, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido/líquido (Anal y Singh, 2007). El tamaño de las gotas formadas a través de la encapsulación se puede clasificar como: macro (>5000 μm): micro (1.0–5000 μm); y nano (<1.0 μm). Las cápsulas con un tamaño inferior a 1.0 μm se denominan con frecuencia nanocápsulas y se fabrican mediante métodos muy especializados de nanoencapsulación (Jafari *et al.*, 2008).

Los procesos de encapsulación se pueden dividir en dos: procesos químicos y procesos mecánicos. Los procesos químicos se dividen en las técnicas de coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial e inclusión molecular; dentro de los procesos mecánicos están las técnicas de secado por aspersion, secado por congelamiento/enfriamiento y extrusión (Madene *et al.*, 2006). Estudios recientes han descrito la preparación de formulaciones secadas por atomización que contienen betalaínas en extractos de remolacha roja (Azeredo *et al.*, 2007), extractos de tuna roja (Sáenz *et al.*, 2009; Gandía-Herrero *et al.*, 2010) y amaranto (Cai y Corke, 2000), en donde obtuvieron que la encapsulación aumentó considerablemente la estabilidad de los pigmentos en diferentes condiciones de temperatura.

En una encapsulación, el material recubierto, es decir, el material de interés, se denomina material activo o núcleo, y el material de recubrimiento se denomina carcasa, material de pared, soporte o encapsulante (Madene *et al.*, 2006). El paso inicial para encapsular un ingrediente alimentario es la selección de un material de pared adecuado, según el material del núcleo y las características deseadas en las microcápsulas finales. En particular, para el encapsulado de sabores y aceite, el material de pared ideal debe tener propiedades emulsionantes; ser un buen formador de película, tener una baja viscosidad a altos niveles de sólidos, exhibir una baja higroscopicidad, liberar el sabor cuando se reconstituya en un producto alimenticio terminado, tener un bajo costo, un sabor suave, un suministro estable y brindar una buena protección al sabor encapsulado y el aceite (Jafari *et al.*, 2008).

Sin embargo, la estabilidad de una encapsulación también depende de la emulsificación, una de las primeras operaciones unitarias en la mayoría de los procesos de encapsulación y es el paso más importante para una encapsulación exitosa (Gouin, 2004). Los parámetros importantes a considerar son la concentración total de sólidos, la viscosidad, la estabilidad, el tamaño de la gota y el método de emulsificación (Jafari *et al.*, 2008).

2.4 Emulsión.

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles (generalmente aceite y agua), y uno de los líquidos se dispersa como pequeñas gotitas esféricas en la otra. Pueden clasificarse convenientemente de acuerdo con la distribución espacial relativa de las fases oleosa y acuosa. Un sistema que consiste en gotitas de aceite dispersas en una fase acuosa se llama emulsión de aceite en agua (O/W), por ejemplo, leche, crema, aderezos, mayonesa, bebidas, sopas y salsas. Las nanoemulsiones de agua en aceite (W/O) forman una clase de emulsiones que tienen gotitas de agua de tamaño nanométrico dispersas en medios orgánicos a través de la acción de los surfactantes, por ejemplo, margarina y mantequilla. También es posible preparar emulsiones múltiples, por ejemplo, aceite en agua en aceite (O/W/O) o emulsiones agua en aceite en agua (W/O/W) (McClements, 2016).

Las emulsiones múltiples son parte de un grupo creciente de emulsiones que, por su estructura, tienen ventajas potenciales sobre las emulsiones convencionales y es probable que encuentren una mayor utilización dentro de la industria alimentaria (McClements, 2016). Aparecen como una estrategia potencialmente útil en procesos de reducción de energía, enmascaramiento de sabores, mejora las propiedades sensoriales, liberación controlada y protección de ingredientes lábiles durante el procesado y conservación de alimentos o incluso de la acción de cierta actividad enzimática tras su ingesta (Benichou *et al.*, 2007). Estudios recientes se han centrado en gran medida en utilizar las emulsiones dobles como vehículos para varios medicamentos hidrófilos (vacunas, vitaminas, enzimas, hormonas, etc.) que se liberarían lentamente de la fase acuosa interna a la externa (Zhang y Reineccius, 2015). Han sido encapsulados compuestos bioactivos como el azafrán, probióticos como *Lactobacillus rhamnosus*, polifenoles como el resveratrol, colorantes como la cúrcuma, carotenoides, antocianinas y betalaínas (Faridi- Esfanjani *et al.*, 2017; Fang y Bhandari, 2010; González *et al.*, 2009; Hemar *et al.*, 2010; Aditya *et al.*, 2015; Rodríguez-Huezo *et al.*, 2014; Kaimainen *et al.*, 2015).



La mayoría de estos estudios de emulsiones están enfocados en emulsiones O/W y O/W/O. Esto debido a que una gran cantidad de tensoactivos o emulsificantes presentan solubilidad en agua, lo que favorece a la formación de este tipo de emulsiones. Por lo que el número de emulsificantes que puede utilizarse para emulsiones W/O, es mucho menor y con ello, más difícil su elaboración. Incluso muchos de los estudios de emulsiones agua en aceite son realizados con PGPR como emulsificante, ya que con algún otro no se obtienen los mismos resultados de estabilidad (McClements, 2016, Zhu *et al.*, 2019)

Un producto encapsulado óptimo se basa en una buena emulsión. La emulsión de gotas más pequeña y estable a menudo resulta en una mayor retención activa; en contraste, la emulsión de gotas de tamaño inestable o grande, se asocia con una retención activa pobre, un rendimiento pobre, un alto contenido de aceite en la superficie y un deterioro acelerado (Gouin, 2004). El tamaño de gota y la estabilidad de las emulsiones dependerá de sus componentes y de la metodología empleada. La formación de una emulsión puede implicar un solo paso o varios pasos consecutivos, dependiendo de la naturaleza del material de partida y el método utilizado para crearlo. Antes de convertir las fases separadas acuosas y oleosas en una emulsión, generalmente es necesario dispersar los diversos ingredientes en la fase en la que son más solubles. Los ingredientes solubles en agua, como proteínas, polisacáridos, azúcares, sales, vitaminas, colorantes, antioxidantes y surfactantes, son generalmente mezclados con el agua. El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se conoce como homogeneización, y las emulsiones pueden formarse utilizando métodos de alta o baja energía según los ingredientes y los enfoques utilizados (McClements, 2016).

2.4.1 Métodos de homogenización.

Los métodos de alta energía suelen utilizar equipos especializados (homogeneizadores) capaces de generar intensas fuerzas disruptivas para mezclar e interrumpir las fases de aceite y agua. Por otro lado, los métodos de baja energía se basan en la formación espontánea de pequeñas cuando las condiciones como la temperatura o la composición cambian de una manera específica (McClements, 2016). Los métodos de baja energía se utilizan para ciertas aplicaciones especializadas dentro de la industria alimentaria (por ejemplo, la producción de algunas emulsiones de bebidas) y se basan en la formación espontánea de gotitas de aceite en ciertos tipos de mezclas de surfactante-aceite-agua cuando su composición o entorno se modifica. Estos métodos incluyen emulsificación espontánea, inversión de fase y el método de inversión de fase catastrófica menos utilizado. Los métodos de baja energía a veces están limitados por el tipo de aceite y tensoactivos que pueden ser usados, por lo que son más utilizados los métodos de alta energía (Singh *et al.*, 2017).

En los métodos de alta energía, la interrupción de la gota se logra principalmente al generar grandes diferencias de presión dentro de dispositivos mecánicos u ondas de ultrasonido, estas fuerzas disruptivas que rompen mecánicamente las fases de aceite y agua (McClements y Jafari, 2018). Los dispositivos mecánicos más utilizados son los mezcladores de alto cizallamiento, los molinos coloidales, los homogeneizadores de válvulas de alta presión, los microfluidizadores y los sonicadores. Los mezcladores de alto cizallamiento (que son un tipo de dispositivo rotor-estator) son los instrumentos más comúnmente utilizados para homogeneizar directamente las fases de aceite y acuosa en la industria alimentaria. La rotación rápida del cabezal de mezcla genera una combinación de gradientes de velocidad radial y longitudinal en los fluidos, que interrumpe las interfaces entre las fases de aceite y agua, hace que los líquidos se mezclen y rompan las gotas más grandes en otras más pequeñas. El diseño del cabezal de mezcla también determina la eficiencia del proceso de homogeneización, y existen diferentes tipos para diferentes situaciones, por ejemplo, palas, hélices y turbinas (McClements, 2016).

Los homogeneizadores ultrasónicos se utilizan ampliamente para producir emulsiones y nanoemulsiones. Este tipo de homogeneizador utiliza ondas ultrasónicas de alta intensidad que generan intensos gradientes de cizallamiento y presión dentro de un material que interrumpe las gotitas principalmente por cavitación y efectos turbulentos (Leong *et al.*, 2011). La cavitación es la formación y colapso de cavidades de vapor en el líquido, generadas por la vibración mecánica de la sonda del sonicador. Cuando el líquido se expone a una potencia ultrasónica muy baja y la potencia aumenta gradualmente, se alcanza un punto en el que la energía acústica transmitida es suficiente para causar cavitación en el fluido, esta energía mínima necesaria para formar cavitación se denomina umbral de cavitación. La emulsificación, se produce solo a una potencia por encima del umbral de cavitación, es por esto que debe determinarse la intensidad a la que se someterá la emulsión (Iqbal *et al.*, 2014).

Los principales factores que determinan la eficiencia de los homogeneizadores ultrasónicos son la intensidad, duración y frecuencia de las ondas ultrasónicas. La mayoría de los emulsionantes naturales son adecuados para usar con la mayoría de los homogeneizadores mecánicos; sin embargo, los polisacáridos o proteínas pueden ser despolimerizados o desnaturalizados dentro de los sonicadores debido a los altos gradientes locales de temperatura y presión, que pueden afectar negativamente su rendimiento funcional (Lee *et al.*, 2003; Hakansson y Hounslow, 2013; Abbas *et al.*, 2013; O'Sullivan *et al.*, 2016). En el contexto de las emulsiones, el término "emulsionante" se refiere a sustancias anfifílicas que tienen la capacidad de adsorber las superficies de las gotitas de aceite, reducir la tensión interfacial y protegerlas de la agregación (McClements y Gumus, 2016).

2.4.2 Emulsificante.

Los emulsificantes o surfactantes son moléculas de superficie activa que se adsorben en la superficie de las gotas recién formadas durante la homogeneización, formando una capa protectora que evita que las gotas se acerquen lo suficiente como para agregarse. La mayoría de los emulsionantes son moléculas anfifílicas, es decir, tienen

regiones polares y no polares en la misma molécula (McClements, 2016). Dentro de la industria alimentaria es común el uso de proteínas anfifílicas, polisacáridos, fosfolípidos y surfactantes de moléculas pequeñas. Sin embargo, los emulsionantes varían enormemente en su efectividad para producir pequeñas gotas de aceite durante la homogeneización, y en su capacidad para prevenir la agregación de gotas bajo diferentes tensiones ambientales, como el pH, la fuerza iónica, el calentamiento y la congelación. También difieren en el costo, la disponibilidad, la facilidad de uso y la compatibilidad con otros ingredientes. (Guzey y McClements, 2006). Es necesario hacer resaltar que no todas las sustancias anfifílicas poseen actividad como surfactante, para que esto suceda es necesario que la molécula posea propiedades relativamente equilibradas, quiere decir, que no sea ni demasiado hidrófila ni demasiado hidrófoba. Según el carácter del extremo hidrófilo las moléculas tensoactivas se clasifican en aniónicas, catiónicas, no iónicas y anfóteras. Los tensoactivos aniónicos son los más comunes en la industria y estos se caracterizan por disociarse en un anión anfifílico concedido por los grupos fosfato, sulfato, carboxilato y sulfonato y en un catión que generalmente es un metal alcalino o un amonio cuaternario. Por otro lado, los tensoactivos catiónicos contienen una carga positiva, siendo la mayoría de estos compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o sal de amonio cuaternario. Los surfactantes no-iónicos no se ionizan en solución acuosa ya que poseen grupos hidrófilos del tipo alcohol, fenol, éter o amida. Los surfactantes anfóteros son aquellos que combinan en su molécula los dos caracteres: aniónico y catiónico. Los emulsificantes más utilizados en la industria alimentaria son principalmente no iónicos (Monoacilgliceroles y esterés de ácidos grasos), aniónicos (sales de ácidos grasos) o anfóteros como la lecitina (Salager, 2002; Tharwat, 2014; Kosegarten- Conde y Jiménez- Munguía, 2012)

Otra clasificación y un auxiliar en la selección de los emulsionantes es el valor de HLB (Balance hidrofílico-lipofílico). Este valor es utilizado para caracterizar emulsionantes en función de su solubilidad, siendo el equilibrio del tamaño y la resistencia de los grupos polares o hidrofílicos y no polares o hidrofóbicos del emulsionante (Lamba *et al.*, 2015). Los valores bajos de HLB se relacionan con los tensoactivos lipofílicos,

mientras que se considera que los tensoactivos hidrofílicos poseen altos valores de HLB. Los emulsionantes solubles en agua con índices de HLB relativamente altos (10-18) se utilizan normalmente para estabilizar emulsiones de aceite en agua, como bebidas, aderezos, postres y blanqueadores de café. Los números de HLB relativamente bajos (3-6) se utilizan a menudo para estabilizar emulsiones de agua en aceite, como margarinas y productos para untar (McClements, 2016). El número HLB no siempre proporciona una buena predicción del rendimiento de los tensoactivos ya que el rendimiento depende también de otros factores como la geometría molecular o interacciones específicas (McClements y Jafari, 2018). En algunas aplicaciones, se puede formular una emulsión utilizando un solo tipo de emulsionante. Sin embargo, en muchas aplicaciones, la formación, la estabilidad y los atributos funcionales de las emulsiones se pueden mejorar mediante el uso de combinaciones de emulsionantes, en lugar de individuales. En las emulsiones dobles, la presencia de dos interfaces diferentes requiere el uso de al menos dos emulsionantes: uno hidrofílico para estabilizar la emulsión externa de aceite en agua y uno lipofílico para estabilizar la emulsión interna de agua en aceite. (McClements y Jafari, 2018).

2.4.3 Tipos de emulsificantes

Uno de los emulsificantes más utilizados en la industria de alimentos son los fosfolípidos, un tipo de tensoactivo natural de molécula pequeña que generalmente deriva de las membranas celulares de tejidos vegetales, animales o microbianos. Naturalmente, los fosfolípidos se componen de una molécula de glicerol, a la que se le unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. Las cadenas de ácidos grasos pueden variar en sus posiciones, longitudes de cadena y grado de insaturación dependiendo del origen biológico de los fosfolípidos. Los fosfolípidos utilizados en aplicaciones de alimentos y bebidas se suelen denominar lecitinas, extraídas de fuentes como la soya, leche, colza y huevo. Las lecitinas consisten en una mezcla compleja de componentes fosfolípidos insolubles en acetona (McClements y Jafari, 2018). Los fosfolípidos más comunes en la lecitina son la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol.

Los grupos de cabeza hidrófila de estas moléculas son aniones (fosfatidilinositol) o zwitterión (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), mientras que los grupos lipofílicos constan de dos ácidos grasos (Figura 3). Los ingredientes naturales de la lecitina tienden a tener un número de HLB bajo a intermedio (2 a 8). Por lo tanto, son adecuados para estabilizar sistemas de agua en aceite, sin embargo, puede utilizarse en combinación con otros tipos de surfactantes para mejorar la estabilidad y formar diferentes estructuras (McClements,2016).

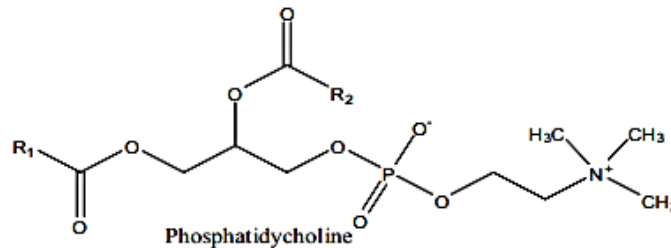


Figura 3. Estructura de la Lecitina (fosfatidilcolina) (Shah *et al.*, 2018).

Por otro lado, son utilizados también tensoactivos de molécula pequeña. Los cuales pueden producirse por esterificación de polioles con ácidos grasos. Los polioles forman parte de los grupos hidrófilos, mientras que las cadenas de ácidos grasos forman el grupo de hidrófobos. Los polioles más comunes son poliglicerol, propilenglicol, sorbitán, polioxietilensorbitán y sacarosa. Los ácidos grasos utilizados para preparar estos tipos de tensoactivos pueden variar en la longitud de su cadena y el grado de insaturación. Los tensoactivos con polioles grandes tienden a ser dispersables en agua y tienen altos índices de HLB (por ejemplo, sacarosa, poliglicerol y ésteres de polioxietilensorbitán), mientras que aquellos con pequeños grupos de cabeza de poliol tienden a ser solubles en aceite y tienen bajo HLB (por ejemplo, ésteres de propilenglicol). Los ésteres de sorbitán de ácidos grasos son uno de los tensoactivos no iónicos solubles en aceite más utilizados, vendidos con el nombre comercial "Span" (Figura 4). Por otro lado, los ésteres de polioxietilensorbitán son uno de los tensoactivos no iónicos solubles en agua más utilizados, que a menudo se venden

bajo el nombre comercial de “Tween” (Figura 5). Generalmente estos tensoactivos se usan en combinación para facilitar la formación y estabilidad (Myers, 2006).

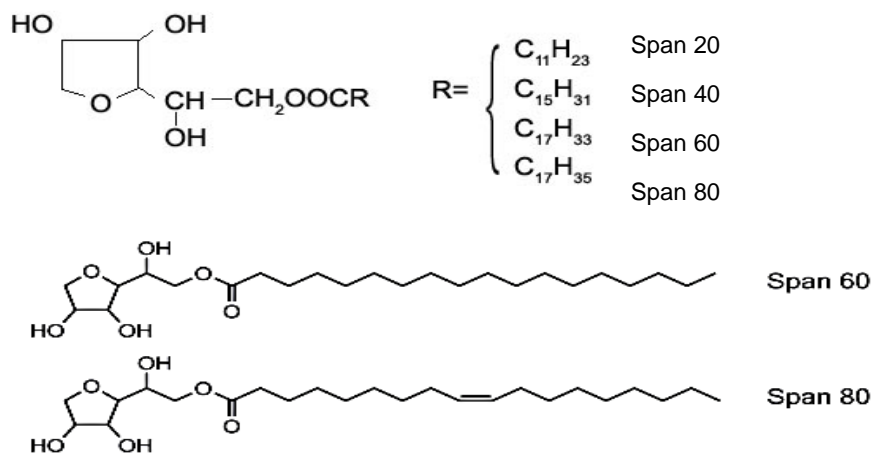


Figura 4. Estructura tensoactivos Span (Bartelds *et al.*, 2018)

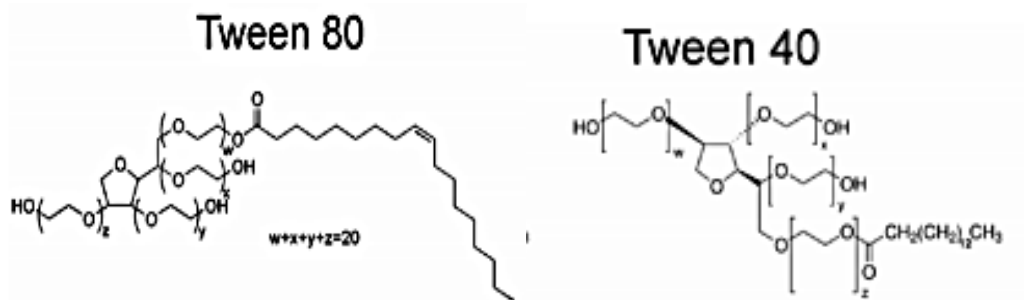


Figura 5. Estructura tensoactivos Tween 80 y Tween 40 (Stoyanova *et al.*, 2016).

En la industria de alimentos, el poliricinoleato de poliglicerol (PGPR), es el emulsificante hidrofóbico más efectivo. Sin embargo, también se han utilizado otros emulsificantes, como la lecitina que tiene ciertas restricciones. Knoth *et al.* (2005) compararon la efectividad del PGPR y la lecitina en emulsiones dobles, teniendo que con un 2.5% de lecitina, en combinación con proteínas, se obtenía un tamaño de gota muy similar a las emulsiones elaboradas con 4% de PGPR. En otros estudios se han



utilizado mezclas de tensoactivos para mejorar la estabilidad de las emulsiones. Tal es el caso de Owusu *et al.* (1992), quienes emplearon Span 80 Y Tween 20 como emulsionantes para la encapsulación de Vitamina B2 y triptofano, logrando aumentar su vida útil.

Los tensoactivos comerciales son de los más utilizados debido a sus propiedades como emulsificante, así como sus bajos costos, sin embargo, en la actualidad se opta por buscar componentes que sean naturales y que permitan tener resultados similares o mejores en la elaboración de emulsiones. Las saponinas son otra fuente de tensoactivo natural, capaz de disminuir la tensión interfacial y estabilizar emulsiones de aceite en agua.

2.5 Saponinas.

Las saponinas son metabolitos secundarios que se encuentran en la mayoría de las especies de plantas. Muchas saponinas son tensoactivas porque están compuestas por uno o más restos de azúcares hidrofílicos unidos covalentemente a un esteroide hidrófobo o esqueleto de triterpeno (Zhu *et al.*, 2019). Se encuentran divididas en dos clases principales que son glucósidos triterpenoides y esteroides cuya caracterización de la estructura varía según el número de unidades de azúcar unidas en diferentes posiciones (Hostettmann y Marston, 1995).

La presencia de saponinas se ha informado en más de 100 familias de plantas y en algunas fuentes marinas, como los peces estrella y el pepino de mar (Hostettmann y Marston, 1995). Las saponinas esteroideas se encuentran principalmente en monocotiledóneas (como *Agavaceae*, *Dioscoreaceae* y *Liliaceae*), y las saponinas triterpénicas están presentes principalmente en las dicotiledóneas (*Leguminosae*, *Araliaceae*, *Caryophyllaceae*) (Sparg *et al.*, 2004). Si bien las principales fuentes dietéticas de saponinas son las leguminosas (soja, garbanzos, frijol mungo, maní, habas, habichuelas, lentejas), también están presentes en la avena, todas las especies de alium (puerro, ajo), espárragos, té, espinacas, remolacha azucarera, y ñame). Las



más estudiadas han sido las de la soya, por su supuesto efecto tóxico hemolítico sobre las células rojas o eritrocitos. Actualmente ya no se consideran dañinas, y se adicionan en bebidas por su sabor amargo y su capacidad para formar espumas (Badui, 2013). El árbol de corteza de jabón (Quillaja saponaria) es una de las principales fuentes no alimentarias de saponinas utilizadas en la salud y aplicaciones industriales (Hostettmann y Marston, 1995).

Las fuentes alimentarias y no alimentarias de saponinas han adquirido un enfoque renovado debido a la creciente evidencia de sus beneficios para la salud, como la reducción del colesterol y las propiedades anticancerígenas (Gurfinkel y Rao, 2003; Kim *et al.*, 2003). Se ha encontrado que las saponinas tienen propiedades farmacéuticas de hemolíticos, molusquicidas, antiinflamatorios, antimicóticos o antimicrobianos, antibacterianos, antiparasitarios, antitumorales y antivirales (Sparg *et al.*, 2004).

Además de las aplicaciones farmacéuticas, las saponinas se han utilizado en alimentos como surfactante natural y sirven como conservantes para controlar el deterioro microbiano de los alimentos. Más recientemente, debido a la preferencia del consumidor por la sustancia natural, la saponina Quillaja se ha utilizado como un agente tensoactivo de molécula pequeña natural en emulsiones de bebidas para reemplazar el tensoactivo sintético de Tweens (Piorkowski y McClements, 2014). Yang *et al.* (2013) han comparado la efectividad del surfactante natural aislado de la corteza del árbol de Quillaja saponaria Molina para formar y estabilizar emulsiones con un surfactante sintético (Tween 80). Después de comparar la influencia de la presión de homogeneización, el número de pases y la concentración de emulsionante en el tamaño de gota producido a partir de estos dos surfactantes, sugirieron que el surfactante natural es un surfactante eficaz que puede reemplazar a los surfactantes sintéticos en productos de alimentos y bebidas. Debido a su característica de espuma natural, en la actualidad se estudia la aplicación de saponinas como un biosurfactante natural para mejorar las propiedades de la superficie de los alimentos (Cheok *et al.*, 2014).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Evaluar la estabilidad de betacianinas (pigmentos rojo-púrpura) y betaxantinas (pigmentos amarillo-naranja) encapsuladas en emulsiones (simple W/O y doble W/O/W) obtenidas utilizando un emulsionante natural (saponinas) y métodos de alta energía (homogenización y/o sonicación).

3.2 Objetivos específicos.

1. Obtener betalaínas de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*).
2. Elaborar y caracterizar emulsiones simples (W/O) de betalaínas utilizando diferentes surfactantes y métodos de alta energía: homogenización y sonicación.
3. Elaborar y caracterizar emulsiones dobles (W/O/W) de betalaínas utilizando saponinas y métodos de alta energía: homogenización y sonicación.
4. Optimizar las condiciones de elaboración de emulsiones (W/O/W): concentración de emulsificante, tiempo y amplitud de sonicación.
5. Evaluar las emulsiones como sistemas de liberación de betalaínas sometidos a diferentes condiciones.
6. Evaluar la estabilidad fisicoquímica de las emulsiones (W/O/W) durante su almacenamiento.
7. Obtener y separar betalaínas de betabel (*Beta vulgaris*) en betacianinas y betaxantinas.
8. Elaborar, caracterizar emulsiones (W/O/W) de betacianinas y betaxantinas.

IV. HIPÓTESIS.

Elaborar emulsiones simples (W/O) y dobles (W/O/W) de betacianinas y betaxantinas mediante el uso de emulsionantes naturales (saponinas) y métodos de alta energía (homogenización y/o sonicación) permitirá obtener emulsiones más estables sometidas a diferentes condiciones de procesamiento (Temperatura, pH y fuerza iónica) evitando la degradación de los pigmentos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material experimental.

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) se obtuvo del estado de Querétaro en la cosecha de Junio-Agosto 2019. El betabel se obtuvo de un supermercado en la ciudad de Chihuahua. Span 80, Tween 80, Tween 40, betanina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Lecitina (CTR Scientific, México), Aceite de canola, Aceite de coco.

5.2 Procesamiento de materia prima.

El garambullo y betabel fueron lavados, desinfectados y procesados mediante un extractor doméstico para obtener una pasta, en la que se tuviera tanto el jugo como las partes sólidas. El betabel fue almacenado hasta su uso en la separación de betalaínas. Por otro lado, el garambullo fue caracterizado en su contenido de humedad, proteínas, lípidos, cenizas y fibra cruda. Los hidratos de carbono disponibles se estimaron mediante la diferencia. Las metodologías se realizaron en base a la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1998). El pH se midió utilizando un potenciómetro con microordenador (HANNA Instruments, modelo EDGE HI2020, RI, EUA). Además, la pasta fue filtrada con papel Whatman 1 y 40 (8-10 μm) para eliminar los sólidos en suspensión y se realizaron mediciones de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) mediante un refractómetro, parámetros de color (L^* , a^* , b^* , croma^* y hue°), polifenoles totales, actividad antioxidante y pigmentos (betacianinas y betaxantinas).



5.3 Procedimiento experimental de emulsiones.

El desarrollo de las emulsiones fue dividido en 6 fases; 1. Emulsiones simples (W/O) con diferentes surfactantes, 2. Efecto de potencia y tiempo de sonicación en emulsiones simples (W/O), 3. Emulsiones dobles (W/O/W), 4. Evaluación de emulsiones dobles (W/O/W) a diferentes condiciones, 5. Evaluación de propiedades fisicoquímicas en emulsiones dobles (W/O/W) y 6. Evaluación de emulsiones dobles (W/O/W) con extracto de betacianina y betaxantina. En la Figura 6 se presenta el diagrama general de fases y posteriormente se describió cada una de ellas.

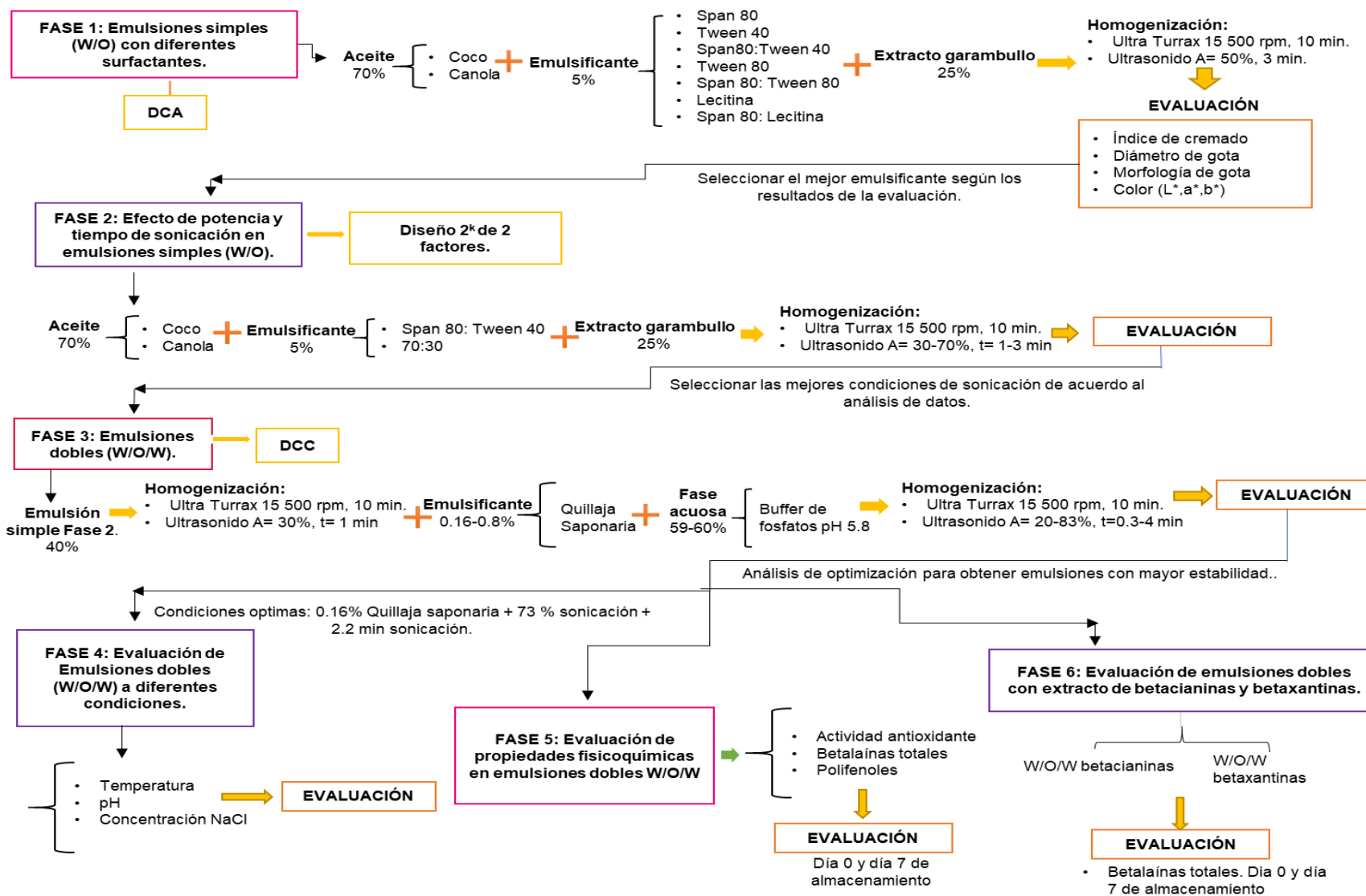


Figura 6. Procedimiento experimental de emulsiones.

5.3.1 FASE 1: Emulsiones simples (W/O) con diferentes surfactantes.

Antes de evaluar los diferentes surfactantes fue necesario conocer la intensidad real que se proporcionaba al sistema. Esto debido a que el ultrasonido se controla por medio de amplitud, pero la intensidad real dependerá del tamaño, composición y formulación de la muestra. Posteriormente se calculó el valor de HLB de las mezclas de emulsificantes para asegurar la formación de una emulsión W/O.

5.3.1.1 Cálculo de intensidad de ultrasonido.

El cálculo de intensidad de ultrasonido se realizó mediante el método calorimétrico propuesto por Mason *et al.* (1992), en donde se sometió a sonicación la mezcla de aceite, extracto y emulsificante (formulación para W/O y W/O/W) a temperatura ambiente y se le midió la temperatura cada 30s con ayuda de un termopar (HANNA® instruments México). Se realizaron gráficos de Temperatura vs. tiempo para obtener el aumento de temperatura en el tiempo cero, estimando $\frac{dT}{dt}$ mediante un ajuste de la curva. Luego se sustituyó el valor de $\frac{dT}{dt}$ en la Ecuación 1 para obtener la potencia y posteriormente se utilizó la Ecuación 2 para el cálculo de intensidad. La amplitud del ultrasonido fue modificada de 20-100% para obtener la energía ultrasónica que realmente ingresa al sistema.

$$P = \frac{dT}{dt} * Cp * M \quad (1)$$

$$I = \frac{P}{V_M} \quad (2)$$

Donde P es la potencia, Cp es la capacidad calorífica de la mezcla (J/kg °C) [Canola 2208 J/kg °C, Coco 2000 J/kg °C], M es la masa (kg), I es la intensidad (W/L) y V_M, el volumen de la mezcla (L) [0.015L].

5.3.1.2 Cálculo de valor de HLB

Para realizar las formulaciones de las mezclas de emulsificantes se tomaron en cuenta los valores de HLB de cada uno de ellos: Span 80 (4.3), Tween 40 (15.6), Lecitina (5-8), Tween 80 (15). Las mezclas debían encontrarse en un valor de HLB entre 3-8 para asegurar la formación de una emulsión W/O. El valor de HLB se calculó con la siguiente ecuación:

$$HLB = HLB_A (X_1) + HLB_B (X_2) \quad (3)$$

Donde X_1 y X_2 es la fracción del emulsificante, multiplicada por su respectivo valor de HLB.

5.3.1.3 Evaluación de surfactantes en emulsiones simples (W/O).

Para el desarrollo de emulsiones simples con diferentes surfactantes se utilizaron, Span 80 (HLB 4.3), Tween 40 (HLB 15.6), Span: Tween 40 (70:30, HLB 7.69), Tween 80 (HLB 15), Span: Tween 80 (70:30, HLB 7.51), lecitina (HLB 5-8) y Span 80: lecitina (70:30, HLB 5.41). Se diluyeron 350 mg de betalaínas de garambullo en 3.75 mL de buffer de citratos (pH 5.8), siendo esta la fase acuosa (25%). La fase oleosa (70%) consistió en aceite de canola y aceite de coco en relación 50:50. Se adicionó el surfactante (5%) a la fase oleosa y se incrementó la temperatura a 40-50°C para posteriormente homogenizar con homogenizador (Ultra-Turrax T-18 digital) a 15 500 rpm durante 10 min, agregando gota a gota la fase acuosa. La emulsión se sometió a ultrasonido en Sonicador Branson (Sanitier Sound Enclosure, Shanghai, China) (A=50%, I= 1708.74 ± 86.80 W/L) durante 3 min (en baño maría con hielo) y se enfrió a 4°C durante 1h. Estas condiciones se seleccionaron en base a trabajo experimental preliminar que consistió en probar diferentes concentraciones, tiempos e intensidades para obtener la mayor estabilidad. En las emulsiones obtenidas se determinó la morfología y tamaño de gota, color e índice de cremado. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

5.3.2 FASE 2: Efecto de potencia y tiempo de sonicación en emulsiones simples (W/O).

En esta fase se evaluó la amplitud (intensidad) de ultrasonido y tiempo de sonicación mediante un diseño 2^k de 2 factores, tal como se observa en la Tabla 1. Se utilizó la mezcla de emulsificantes Span 80: Tween 40 en relación 70:30, betalaínas de garmbullo como fase acuosa (25%) y aceite coco: canola (50:50) como fase oleosa (70%). La emulsión se realizó mediante homogenización a 40-50°C con Ultra Turrax (15 500 rpm, 10 min) para posteriormente evaluar el uso de ultrasonido por medio de un Ultrasonido Branson (Sanitier Sound Enclosure, Shanghai, China), variando la amplitud de potencia entre 30 y 70% con un tiempo de sonicación entre 1 y 3 min (manteniendo la temperatura menor a 50 °C). Estas condiciones fueron seleccionadas de acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa anterior. La optimización del tiempo de sonicación y el nivel de intensidad es necesaria para producir emulsiones con pequeñas gotas que gastan la cantidad mínima de energía, minimizando así los costos (Vélez-Erazo *et al.*, 2018). Las emulsiones fueron analizadas mediante parámetros de color, morfología y tamaño de gota e índice de cremado.

5.3.3 FASE 3: Preparación de emulsiones dobles (W/O/W).

Las emulsiones dobles se realizaron en dos fases. La primera fase consistió en el desarrollo de la emulsión simple (W/O), utilizando como fase acuosa (25%) las betalaínas en una concentración del 10%. La fase oleosa (70%) consistió en la mezcla de aceite coco:canola en relación 50:50 y la mezcla de emulsificantes (5%) fue Span 80:Tween40 (70:30). La homogenización se realizó mediante un homogeneizador Ultra-Turrax T-18 (15 500 rpm, 10 min, 30-40°C) y posteriormente ultrasonido con una amplitud de 30% ($I=935$ W/L) durante 1 min (Condiciones resultado de la etapa anterior). La segunda fase consistió en tomar un 40% de la emulsión simple y adicionar una fase acuosa con diferentes concentraciones de Quillaja Saponaria como emulsificante (0.3, 0.5 y 0.7%). Se evaluó también la intensidad y el tiempo de



ultrasonido para obtener una emulsión W/O/W estable, mediante un diseño central compuesto. Los parámetros utilizados se pueden observar en la sección 5.5, Tabla 2.

5.3.3.1 Optimización y verificación experimental.

Mediante un análisis de optimización se seleccionaron las emulsiones que presentaron mejores propiedades, es decir, menor índice de cremado, menor tamaño de partícula, así como un mayor valor del parámetro a^* de color. Los parámetros obtenidos se utilizaron para elaborar emulsiones dobles con diferentes extractos y se realizó una comparación con los valores obtenidos en el modelo matemático, utilizando el error relativo como un indicador del ajuste del modelo.

5.3.4 FASE 4: Evaluación de estabilidad de emulsión doble a diferentes condiciones.

5.3.4.1 Influencia de pH.

Las emulsiones recién producidas (10 mL, pH 5.8) fueron ajustadas a pH de 2,4,6,8 y 10, utilizando soluciones de HCl o NaOH según fuera el caso. Finalmente, las muestras se almacenaron en frascos cerrados a temperatura ambiente durante 24 h antes de medir el tamaño de gota y el índice de cremado (Ozturk *et al.*, 2014).

5.3.4.2 Influencia de fuerza iónica.

A las emulsiones recién producidas (10 mL, pH 5.8) se les agregó una solución de NaCl 1 M para obtener muestras con un rango de diferentes concentraciones de sal final (100, 200, 300, 400 y 500 mM). Las muestras se agitaron en vórtex durante aproximadamente 15 segundos y se almacenaron en frascos cerrados durante 24 horas a temperatura ambiente antes de medir el tamaño de gota y el índice de cremado (Ozturk *et al.*, 2014).

5.3.4.3 Influencia de temperatura.

Las emulsiones recién producidas (10 mL, pH 5.8) se colocaron en baños de agua establecidos a diferentes temperaturas (30, 45, 50, 75 y 90 ° C) durante 30 minutos, y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron y almacenaron en frascos cerrados durante 24 horas a temperatura ambiente antes de las mediciones del tamaño de gota y las observaciones de índice de cremado (Ozturk *et al.*, 2014).

5.3.5 FASE 5: Evaluación fisicoquímica de emulsiones dobles.

Para conocer la estabilidad fisicoquímica, así como el porcentaje de encapsulación de las betalaínas dentro de las emulsiones dobles, se analizaron propiedades como tamaño de gota, actividad antioxidante, contenidos de polifenoles totales, betacianinas, betaxantinas, tanto al día 0 de elaboración como al día 7 de almacenamiento. Todo esto en las emulsiones dobles elaboradas con las condiciones a las que logró mayor estabilidad, utilizando extracto simple y extracto concentrado. La separación de fases para el análisis se realizó a 60°C con una posterior centrifugación (3600 x g, 20 min) y filtrado a 0.45 µm para obtener la fase acuosa. Este análisis se realizó por duplicado.

5.3.6 FASE 6: Emulsiones dobles con extracto de betacianina y betaxantina.

Para evaluar la estabilidad de betacianinas y betaxantinas encapsuladas en emulsiones, se utilizaron las condiciones óptimas de procesamiento, es decir, emulsión simple 40% (Sección 6.6.5), 0.16% de quillaja saponaria, 59.84 % buffer de fosfatos. Los extractos utilizados consistieron en 0.17 y 0.19 g de betacianinas y 0.07 y 0.1 g de betaxantinas disueltos en 5 mL de buffer de fosfatos. Estas muestras se obtuvieron de la separación de extracto de betabel con la metodología antes descrita y fueron analizados también por espectrofotometría y HPLC. Las emulsiones fueron realizadas por duplicado y fueron evaluadas en morfología, tamaño de partícula, índice de



cremado y color. Posteriormente se evaluó la estabilidad de betalaínas totales y parámetros de color al día 7 de almacenamiento.

5.4 Métodos fisicoquímicos.

5.4.1 Betalaínas

5.4.1.1 Extracción para determinación de betalaínas.

Los betalaínas se obtuvieron mediante el método descrito por Castellanos y Yahia (2008) con algunas modificaciones. El garambullo o betabel se mezcló con agua en una relación 1:10 durante 20 min utilizando un baño de ultrasonido Branson 1800 (Brasonic®, E.U.A), manteniendo la temperatura menor a 40°C. Las muestras se centrifugaron a 3 600 × g a 10 °C durante 20 min en una centrífuga IEC Centra CL3R (Thermo Electron Corporation, EE.UU.); repitiendo ambos procesos para asegurar la extracción. Los sobrenadantes se filtraron en un filtro de 8-10 µm (Whatman® #1 y #40). Los extractos se liofilizaron en liofilizadora LABCONCO FreeZone 25 plus (© Labconco, E.U.A) y fueron analizados por fotometría (betalaínas totales) y por HPLC para betalaínas específicas. El diagrama del proceso se observa en la Figura 7.

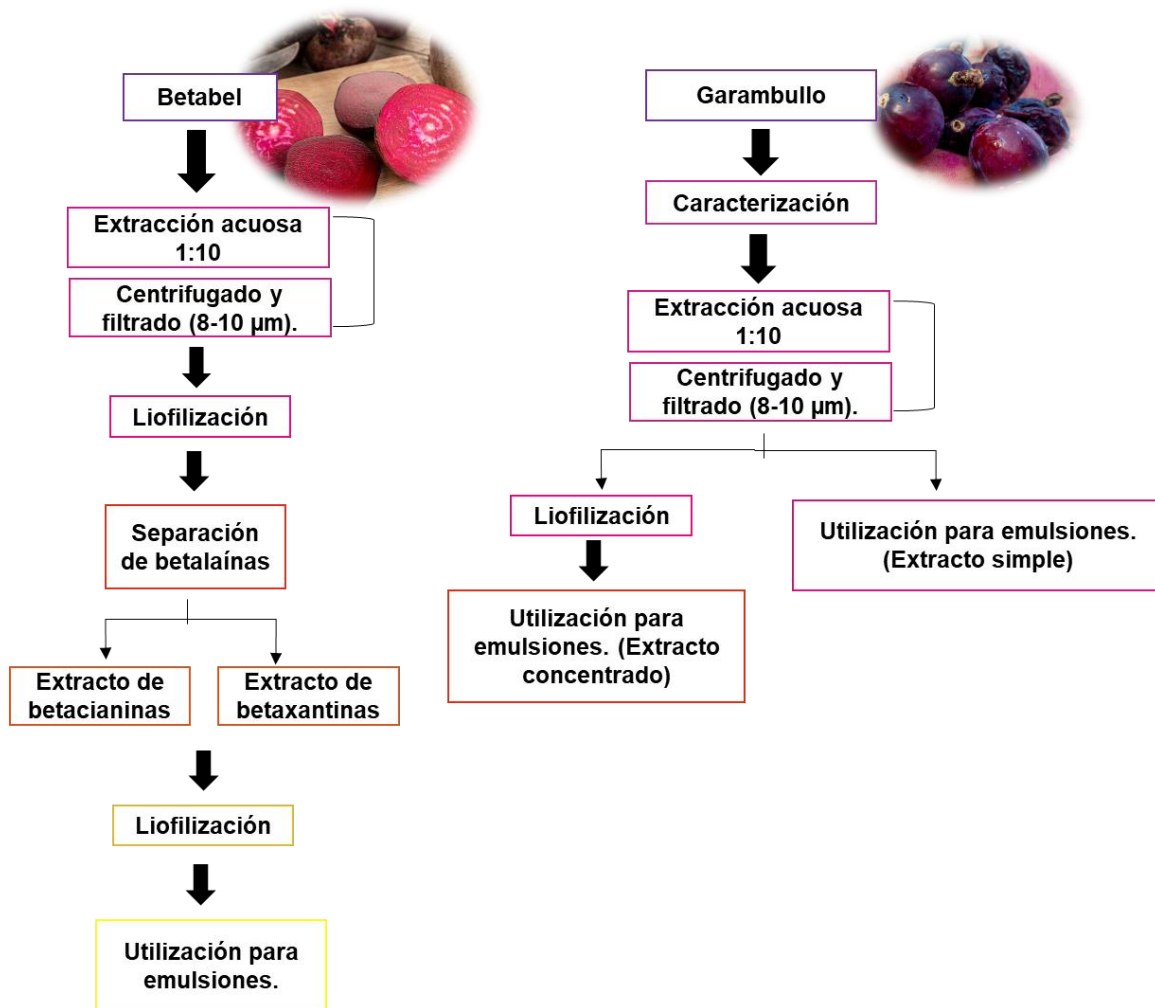


Figura 7. Procedimiento para la obtención de extractos de garambullo y betabel.

5.4.1.2 Separación de las betalaínas.

Para la purificación de los pigmentos se utilizó cromatografía en capa fina (TLC) analítica o preparativa de acuerdo al método propuesto por Bilyk (1981) con algunas modificaciones. Se disolvieron 250 mg del extracto liofilizado (en este caso de betabel) en 1 mL de buffer de citratos a pH 5.8 y se aplicaron en forma de banda, sobre placas de celulosa microcristalina K2F (Whatman, USA) de 20x20 cm y 250 µm de espesor. Para la elusión se utilizó una mezcla de 2-propanol: etanol: agua: ácido acético (55:20:20:5). Las fases obtenidas fueron suspendidas en agua y centrifugadas a 3 600 × g a 10 °C durante 20 min en una centrífuga IEC Centra CL3R (Thermo Electron Corporation, EE.UU. Posteriormente se filtraron con filtro Whatman 1 y se liofilizaron para utilizarlas en emulsiones. Los pigmentos obtenidos fueron analizados mediante fotometría (betalaínas totales) y HPLC (betalaínas específicas).

5.4.1.3 Cuantificación de betalaínas totales.

La cuantificación de betalaínas totales se realizó en el jugo de garambullo, en los extractos tanto de garambullo como de betabel y en la fase acuosa de emulsiones dobles. Esta determinación se realizó de acuerdo a Castellanos y Yahia (2008), utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. La cuantificación de betalaínas se calculó aplicando la ecuación 4:

$$BC [mg/g] = \left[A * DF * MW * \frac{VD}{\epsilon * L * Wd} \right] \quad (4)$$

donde A es la absorción a 535 nm para betacianinas y 483 nm para betaxantinas; DF es el factor de dilución; VD es el volumen de la solución (mL); Wd es el peso del producto deshidratado (g); L es el paso óptico de la cubeta (1 cm); MW y ϵ son el peso molecular y el coeficiente de absorción molar, respectivamente [Betacianina = 550 g/mol; ϵ = 60 000 L/ (mol cm) en agua y Betaxantina = 308 g/mol; ϵ = 48 000 L/ (mol cm)]. Los resultados se expresaron como mg de betacianinas o betaxantinas (según sea el caso) por gramo de muestra (mg Bc, Bx/g). Las mediciones se realizaron por triplicado y se reportaron valores medios con su desviación estándar.

5.4.1.4 Identificación de betalaínas específicas, por HPLC.

La identificación de algunas betalaínas específicas mediante cromatografía líquida de alta presión se realizó mediante el método descrito por Castellanos y Yahia (2008). Fueron analizadas muestras de jugo, tanto de garmbullo como de betabel y los extractos obtenidos en la separación de betalaínas. Las muestras se filtraron a través de filtros de nylon de 0.45 μm , se inyectaron 20 μL en el equipo UHPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 equipado con una columna Thermo Scientific en fase reversa (C18, 250 x 4.6 mm; tamaño de gota 0.5 μm), y un detector de UV (DAD Varian ProStar modelo 410, Palo Alto, CA). La fase móvil A: metanol/ KH_2PO_4 0.05 M (18:82 v/v) pH=2.75 con ácido fosfórico, y la fase móvil B: metanol, se ajustaron a un gradiente de 100% de A hasta 80% de A y de 20% B en 20 min a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 481 y 536 nm para betaxantinas y betacianinas, respectivamente.

5.4.2 Polifenoles.

El contenido de polifenoles totales se determinó mediante una modificación del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999); donde se tomaron 30 μL del extracto, 3 mL de agua destilada y 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se colocaron en un tubo de ensaye dejando reaccionar por 10 min, a temperatura ambiente (25 $^\circ\text{C}$). Posteriormente, se añadieron 600 μL de una solución de carbonato de sodio al 20% y se incubaron por 20 min a 40 $^\circ\text{C}$ en un baño de temperatura controlada (Fisher Scientific, modelo 210, EUA). Se enfriaron en un baño de hielo y el color desarrollado durante ese tiempo se midió a 760 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA). Para realizar la curva de calibración se utilizó ácido gálico en una concentración de 25 a 500 ppm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por cada gramo de muestra en base seca (mg EAG/ g de muestra). Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se reportaron valores medios con su desviación estándar.

5.4.3 Actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante se midió usando el método del radical libre 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995), el cual se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH• por antioxidantes. Se colocaron 0.1 mL de muestras de emulsiones en tubos de ensaye y se les agregaron 3.9 mL de solución de DPPH• 100 mM en metanol. Se agitaron vigorosamente y se mantendrán en la oscuridad durante 3 h, pasado este tiempo se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA). Para realizar la curva de calibración se utilizó Trolox en una concentración de 0.02 a 1 mM. Como blanco se utilizó metanol con el mismo tratamiento que el resto de las muestras. Los resultados se expresaron en milimol equivalentes de trolox por gramo de muestra en base seca (mmol ET/g b.s.). Dicha determinación se realizó por triplicado para cada muestra y se reportaron valores medios con su desviación estándar.

5.4.4 Azúcares reductores.

La determinación de azúcares reductores se realizó de acuerdo al método de Miller (1959) el cual se basa en que el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él y se desarrolla un cambio de color que va desde el amarillo hasta el café. Se mezclaron 0.5 mL de cada muestra con 0.5 mL del reactivo DNS, se colocaron a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se añadieron 5 mL de agua destilada, se agitaron, se dejaron reposar durante 15 min y se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS, EUA) a 540 nm. Se obtuvo una curva de calibración con soluciones estándar de glucosa de 50 a 500 ppm. Como blanco se utilizó agua ultra pura con el mismo tratamiento que las muestras. Los resultados se expresaron como mg de glucosa por cada gramo de muestra en base seca (mg Glu/ g b.s.). La prueba se realizó por triplicado y se reportaron valores medios con su desviación estándar.

5.4.5 Análisis de color.

La medición del color se realizó utilizando un colorímetro Konica Minolta CR-400/410 (Minolta Co., Osaka, Japón), calibrado con un mosaico estándar con valores de $X = 94.9$, $y = 0.3185$ y $x = 0.124$. El color se expresó mediante los parámetros L^* [luminosidad; tendencia al negro (0) – blanco (100)], a^* [tendencia verde (-) – rojo (+)], y b^* [tendencia azul (-) – amarillo (+)], estos valores se utilizaron para calcular Croma^* y hue° utilizando el método descrito por Kha *et al.* (2010). Croma^* indica la intensidad del color y se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Croma}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (5)$$

El ángulo hue° indica la pureza del color, los ángulos pueden variar entre 0° (color rojo), 90° (color amarillo), 180° (color verde) y 270° (color azul). El ángulo de color se calculó usando la siguiente ecuación:

$$H^\circ = \arctan(b^* / a^*) \quad (6)$$

5.4.6 Eficiencia de encapsulación.

La eficiencia de encapsulación (EE) se determinó basándose en la metodología propuesta por Comunian *et al.* (2018) y Shu *et al.* (2006) con ligeras modificaciones, mediante la relación presentada en la Ecuación 7. Inicialmente se realizó el análisis de betalaínas, polifenoles y actividad antioxidante del extracto de garambullo. Las emulsiones dobles fueron sometidas a calentamiento hasta alcanzar 60°C para su separación. Posteriormente fueron centrifugadas a $3\,600 \times g$ a 4°C durante 20 min en una centrífuga IEC Centra CL3R (Thermo Electron Corporation, EE.UU.). El extracto separado fue filtrado a $0.45 \mu\text{m}$ y se determinó su contenido de betalaínas totales, actividad antioxidante y polifenoles.

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{Total de principio activo}} * 100 \quad (7)$$

5.4.7 Índice de cremado.

Para investigar la estabilidad de las emulsiones a lo largo del tiempo se utilizó la metodología descrita por Rabelo *et al.* (2018). Se colocaron las emulsiones a 4°C durante 24h y a temperatura ambiente 1h. Las muestras se evaluaron visualmente en cuanto a su homogeneidad y/o cualquier separación de fase. El índice de cremado (IC) representa la cantidad de separación de fase debido al movimiento de flotación, floculación o coalescencia. En una muestra con una zona de inestabilidad clara, que contenga separación de fases y una zona homogénea estable, el IC se calculó utilizando la relación entre las alturas de las zonas inestables (H_i) de la muestra en un tubo y la altura total (H_w). Se utilizó un calibrador Vernier digital para evaluar el IC y se calculó con la ecuación 8.

$$IC = \frac{H_i}{H_w} * 100 \quad (8)$$

5.4.8 Morfología y tamaño de gota.

La morfología y tamaño de gota de las emulsiones se observó y midió utilizando un microscopio óptico Olympus BX41 con software de cámara DP72. Para cada emulsión se tomaron 5 fotografías en diferentes puntos del portaobjetos utilizando objetivos entre 40-100X. En cada fotografía se realizó el conteo de gotas y las mediciones de diámetro correspondientes mediante el software de análisis Image Pro-Plus. Cada emulsión se realizó por triplicado y se presentaron los valores medios en μm para tamaño de gota y en Log Esferas/ mL junto a su desviación estándar.

5.5 Diseño experimental y análisis de datos.

Las emulsiones simples se evaluaron utilizando un diseño completamente al azar (DCA). Se emplearon 7 tratamientos experimentales (4 surfactantes y 3 mezclas), cada uno de ellos por triplicado. Se analizó color, índice de cremado y tamaño de gota utilizando Minitab (Statistical Software, 2013), versión 17. Para la evaluación de intensidad y tiempo de ultrasonido se utilizó un diseño factorial 2^k , que se muestra en la Tabla 1. Se obtuvieron 10 tratamientos con variaciones de Amplitud y tiempo de sonicación definidas en pruebas preliminares ($A= 30-70 \%$; $t= 1-3 \text{ min}$). Las diferencias entre tratamientos fueron presentadas mediante una prueba de Tukey.

TABLA 1. Diseño 2^k utilizando amplitud y tiempo como factores.

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	Amplitud	Tiempo
7	1	1	1	30	3
5	2	1	1	30	1
5	3	1	1	70	3
1	4	1	1	30	1
10	5	0	1	50	2
6	6	1	1	70	1
4	7	1	1	70	3
2	8	1	1	70	1
13	9	1	1	30	3
9	10	0	1	50	2

Mientras que las emulsiones dobles se evaluaron utilizando un diseño central compuesto (DCC) de tres factores: Amplitud (X_1), concentración (X_2) y tiempo (X_3), 8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 6 puntos centrales, dando un total de 20 tratamientos experimentales (Tabla 2). Mediante pruebas preliminares se designaron los límites de los factores: $30 \leq X_1 \leq 70$, $0.3 \leq X_2 \leq 0.7$ y $1 \leq X_3 \leq 3$. Para cada una de las emulsiones se realizaron mediciones de color, tamaño de gota e índice de cremado, analizando cada respuesta en software Minitab® y Design expert®,

presentando el análisis de varianza y gráficos de superficie de respuesta. El diseño esta dado por el modelo de segundo orden presentado a continuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (9)$$

En donde, Y es la respuesta estimada, β_n , son los coeficientes para cada termino lineal y de interacción y ε es el error. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de optimización para determinar el mejor tratamiento, así como una comprobación del modelo, utilizando Minitab®.

TABLA 2. Diseño central compuesto en emulsiones dobles.

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	X ₁	X ₂	X ₃
6	1	1	1	83.63	0.50	2.00
17	2	0	1	50.00	0.50	2.00
12	3	-1	1	30.00	0.70	3.00
8	4	1	1	50.00	0.50	2.00
1	5	1	1	50.00	0.50	3.68
16	6	0	1	70.00	0.70	1.00
15	7	0	1	50.00	0.16	2.00
20	8	0	1	30.00	0.30	1.00
11	9	-1	1	70.00	0.70	3.00
18	10	0	1	70.00	0.30	3.00
4	11	1	1	50.00	0.50	2.00
3	12	1	1	30.00	0.70	1.00
7	13	1	1	50.00	0.50	2.00
2	14	1	1	50.00	0.50	2.00
14	15	-1	1	50.00	0.50	0.31
5	16	1	1	50.00	0.50	2.00
19	17	0	1	30.00	0.30	3.00
13	18	-1	1	70.00	0.30	1.00
9	19	-1	1	50.00	0.83	2.00
10	20	-1	1	16.36	0.50	2.00



Por otro lado, la evaluación de emulsiones dobles a diferentes condiciones se realizó mediante un diseño completamente al azar, en donde se tenían 5 tratamientos para cada variable (temperatura, pH, concentración). Cada tratamiento se realizó por triplicado y se analizaron parámetros de color, tamaño de gota e índice de cremado. En el caso de la estabilidad fisicoquímica de las emulsiones y la estabilidad de betacianinas y betaxantinas, se realizaron como pruebas pareadas, en las que fueron utilizados 2 extractos con el mismo tratamiento (por duplicado). Se analizaron las variables de tamaño de gota, índice de cremado, color, actividad antioxidante, polifenoles y betalaínas, tanto al día 0 como al día 7, mediante pruebas de t-pareada. Todo lo anterior en software Minitab ®.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Caracterización de materia prima.

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) presentado en la Figura 8, se obtuvo del estado de Guanajuato en la cosecha Junio- Agosto del 2019. El fruto tiene un peso promedio de 1.65 ± 0.08 g, un largo de 1.85 ± 0.05 cm y un ancho de 0.72 ± 0.03 cm. Se realizó un análisis proximal (Tabla 3) y se evaluó fisicoquímicamente, mostrando su composición en la Tabla 4.



Figura 8. Garambullo congelado.

TABLA 3. Análisis proximal en base húmeda de Garambullo.

Parámetro	Contenido*
Humedad (%)	73.37 ± 1.54
Fibra cruda (%)	3.33 ± 0.09
Carbohidratos (%)	11.70 ± 1.37
Proteínas (%)	9.54 ± 0.08
Grasa (%)	0.56 ± 0.09
Cenizas (%)	1.49 ± 0.28

*Media \pm desviación estándar (n=3)

Los resultados del análisis proximal muestran que el garambullo contiene alto contenido de humedad, siguiendo de un contenido de carbohidratos del 11.7% y un alto contenido en proteínas con un 9.54%. Estos valores son similares a lo reportado por Guzmán-Maldonado *et al.* (2010), en donde las especies de garambullo provenientes de Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí presentan un contenido de carbohidratos entre 10.3-10.6% y un contenido de proteínas entre 7 y 9%.

Dentro de los análisis fisicoquímicos, en la Tabla 4 se muestra que el fruto de garambullo tiene una actividad antioxidante de 10.96 ± 0.48 mmol ET/100g b.s*, siendo similar a lo reportado por Mancera-Rodríguez *et al.* (2019). El valor encontrado es mayor al reportado en otros frutos como la tuna (Butera *et al.*, 2002), sin embargo, Wu *et al.* (2005) en su estudio sobre la actividad antioxidante en pitaya roja menciona que existe un rango para las cactáceas entre 28.3 ± 0.83 y 175 ± 15.7 $\mu\text{mol/g}$ que depende del origen del fruto y las condiciones de cosecha, estando entonces el garambullo dentro del rango reportado. Por otro lado, se encontró un contenido de polifenoles totales de 517.43 ± 3.76 mg EAG/ 100g b.s* (137.79 mg EAG/ 100g b.h*), siendo este menor a lo reportado por Herrera-Hernández *et al.* (2011) y Guzmán- Maldonado *et al.* (2010) para frutos maduros de garambullo (912-1046 mg EAG/ 100g b.h).

Dentro de los parámetros de color, L*, que representa la luminosidad [tendencia de negro (0) a blanco (100)] se encuentra más cercano al negro con un valor de 21.36 ± 0.07 . El parámetro de color a*, que representa la tendencia del verde (-) al rojo (+), al ser un valor positivo de 6.68 ± 0.05 , lo cual muestra inclinación al color rojo. El parámetro de color b*, que representa las tendencias de coloración de azul (-) a amarillo (+), se observa un valor negativo de -3.19 ± 0.03 (Tabla 4) indicando mayor tendencia al color azul. Estos valores son similares a lo reportado por Guzmán-Maldonado *et al.* (2010) con valores de L* entre 15-16, valores de a* entre 6-8 y valores de b* entre 0.1-0.4. Las variaciones obtenidas pueden deberse a el tiempo, lugar y condiciones de cosecha, así como la especie utilizada. Según Herrera-Hernández *et al.* (2011) uno de los factores que influyen en los parámetros de color es la madurez

del fruto siendo mayor la tendencia a las tonalidades negras, rojas y azules a medida que aumenta la madurez del garambullo.

La coloración del fruto viene dada mayoritariamente por las betalaínas, pigmentos presentes en el garambullo. El fruto presenta un contenido de betalaínas totales de 0.76 mg/g b.h, 2.73 mg/g b.s*, siendo este valor mayor a lo reportado para diferentes especies en México (2.41–2.89 mg/kg b.h) (Guzmán- Maldonado *et al.*, 2010; Reynoso *et al.*, 1997). En comparación a otras plantas, los valores encontrados son mayores a lo reportado para tuna roja (0.317 mg/g b.h) (Sáenz *et al.*, 2009) y menores a lo reportado para betabel (5-7 mg/g b.s) (Zamudio-Flores *et al.*, 2015; Righi Pessoa y Bolanho, 2018).

TABLA 4. Características fisicoquímicas del Garambullo.

Parámetro	Contenido*
Sólidos solubles (°Brix)	16 ± 0.00
pH	3.96 ± 0.02
Actividad antioxidante (mmol ET/100g b.s*)	10.96 ± 0.48
Polifenoles totales (mg EAG/100g b.s*)	517.43 ± 3.76
Azúcares Reductores (g Glu/100g b.s*)	24.18 ± 0.07
Betacianina (mg BC/g b.s*)	1.88 ± 0.09
Betaxantina (mg BX/g b.s*)	0.85 ± 0.07
L*	21.36 ± 0.07
a*	6.68 ± 0.05
b*	-3.19 ± 0.03

*Media ± desviación estándar; ET = Equivalentes Trolox; EAG = Equivalentes de Ácido Gálico; BC = Equivalentes Betacianinas; BX = Equivalentes de Betaxantinas; Glu= Equivalentes de glucosa.

6.2 Intensidad de ultrasonido.

Para la estabilidad de las emulsiones uno de los factores que tienen mayor impacto es la intensidad de ultrasonido puesto a que de esta depende el tamaño de gota obtenido. Utilizando el método calorimétrico se determinó la intensidad real de ultrasonido en las emulsiones elaboradas con aceite de coco, aceite de canola y extracto de betalaínas (35:35:30). Se obtuvieron las cinéticas de Temperatura vs. tiempo para cada una de las amplitudes entre 20 y 80%, y se ajustaron para determinar $\frac{dT}{dt}$ en $t=0$. En la Figura 9 se puede observar el aumento de temperatura en el transcurso del tiempo y que en amplitudes más altas existe un punto en el que la temperatura comienza a ser constante debido a la evaporación de la fase acuosa de la emulsión. Los mejores resultados de estabilidad, basados en las emulsiones que mostraron menor separación de fases y menor alteración en la temperatura, se obtienen a los 3 min de procesamiento, por lo que se seleccionó ese tiempo para el desarrollo de las emulsiones en la primera fase. Los valores de intensidad obtenidos se muestran en la Tabla 5, variando la intensidad entre 380-3000 W/L.

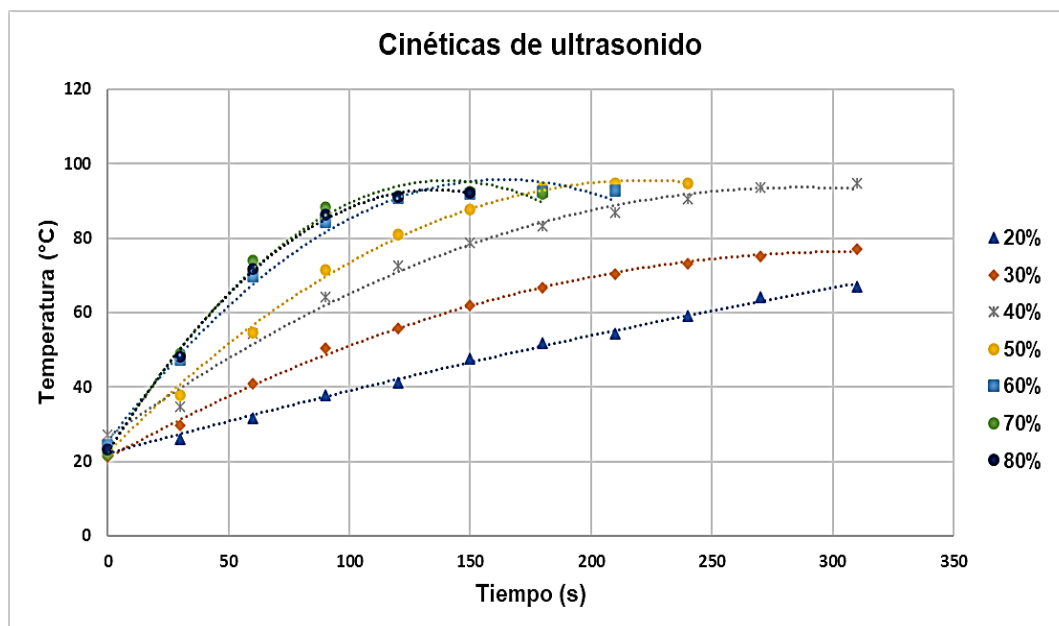


Figura 9. Gráfico de cinética de ultrasonido en diferentes amplitudes.

TABLA 5. Potencia e Intensidad de ultrasonido a diferentes amplitudes.

Amplitud %	Potencia W	Intensidad W/L
20	5.64 ± 0.71	388.81 ± 49.05
30	13.56 ± 1.58	935.43 ± 109.22
40	17.72 ± 0.07	1222.12 ± 4.57
50	24.77 ± 1.26	1708.74 ± 86.80
60	32.45 ± 1.96	2237.83 ± 134.96
70	39.08 ± 3.43	2695.45 ± 236.60
80	38.90 ± 4.07	2682.50 ± 280.73

*Media ± desviación estándar (n=2)

6.3 Emulsiones simples con diferentes surfactantes

6.3.1 Morfología de gota en la emulsión.

Inicialmente, se realizaron emulsiones (W/O) en relación 70:25:5 (aceite: extracto: emulsificante), modificando únicamente el tipo de emulsificante para evaluar la estabilidad y la eficiencia de cada uno de ellos. Justo después de ser elaboradas se observó la morfología y el tamaño de gota de las emulsiones en un microscopio óptico Olympus. Morfológicamente, todas las emulsiones presentan gotas esféricas, sin embargo, como se observa en la Figura 10, las emulsiones elaboradas con Span 80, Tween 40 y Span:Lecitina contienen gotas deformadas o aglomeraciones de las mismas, que pueden influir en su estabilidad. Para todas las emulsiones se tienen gotas de distintos tamaños, por lo que se denominan emulsiones polidispersas, característica normal de las emulsiones alimentarias (McClements, 2016). También se determinó que las emulsiones elaboradas con mezclas de emulsificantes presentan mayor movimiento de gotas, es decir, se encuentran de forma dispersa e incluso la forma esférica se observa con mayor claridad. Caso contrario a las emulsiones que contienen emulsificantes de forma individual, en las que las gotas se observan de manera estructurada.

El proceso de ruptura de una emulsión puede involucrar cuatro diferentes mecanismos: cremado/sedimentación, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald. La floculación es el proceso en el cual dos o más gotas se asocian entre sí, pero mantienen sus integridades individuales. En la Figura 10 puede observarse una tendencia hacia la floculación en las emulsiones elaboradas con Span 80, Tween 40 y Lecitina. La floculación provoca un aumento pronunciado de la viscosidad de la emulsión e incluso puede conducir a la formación de un gel a concentraciones de gotas suficientemente altas (McClements, 2016). La floculación tiene que ver con que las interacciones atractivas (van der Waals, hidrofóbicas y de agotamiento) superan las interacciones repulsivas (estéricas y electrostáticas). La utilización de emulsificantes mixtos puede incrementar las interacciones repulsivas entre gotas y, por tanto, mejorar la estabilidad de floculación (McClements y Jafari, 2018). Las emulsiones elaboradas con Span: Tween 40 y Span: Tween 80 muestran una mejor dispersión de gotas (Figura 10).

Por otro lado, la coalescencia es el proceso mediante el cual dos o más gotas de líquido se fusionan para formar una única gota. Este efecto hace que las gotas de emulsión se pongan en crema o sedimenten rápidamente debido al aumento de tamaño (McClements, 2016). Las emulsiones elaboradas con Span 80, Tween 40 y Span 80: Lecitina, presentan fusión de gotas y un aumento de tamaño. En algunos estudios se ha demostrado que la coalescencia puede disminuirse al utilizar mezclas de surfactantes, sin embargo, en este caso se observa que en la mezcla de Span 80: L0ecitina, la incorporación de Span 80 desestabiliza la emulsión. Resultados similares se obtuvieron en Van Aken (2003) en donde, al mezclar Span con proteínas de la leche se provoca movilidad de las moléculas y existe coalescencia debido a que las moléculas de Span no son suficientes para proteger las gotitas de la coalescencia. En otros casos, se demostró que la mezcla de Tween 80 con fosfolípidos puede mejorar la estabilidad de la emulsión evitando la coalescencia debido a su capacidad por aumentar las fuerzas de repulsión y con esto favorecer la dispersión de las moléculas (Nikiforidis y Kiosseoglou, 2011; McClements y Jafari, 2018).

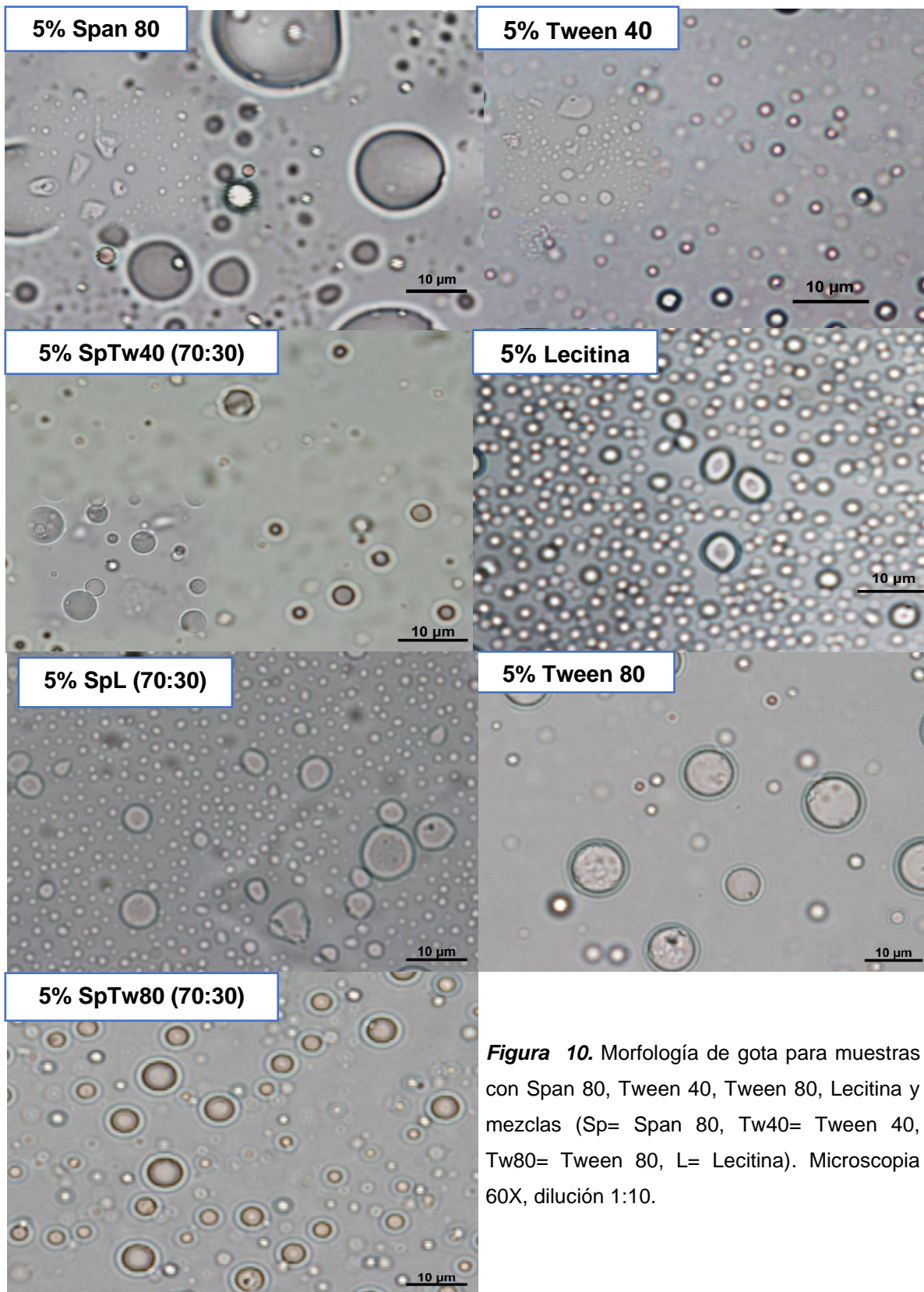


Figura 10. Morfología de gota para muestras con Span 80, Tween 40, Tween 80, Lecitina y mezclas (Sp= Span 80, Tw40= Tween 40, Tw80= Tween 80, L= Lecitina). Microscopia 60X, dilución 1:10.

6.3.2 Tamaño de gota

El diámetro de gota de cada una de las emulsiones se observa en la Tabla 6, presentando la media de todos los tamaños de gota encontrados. Para estas mediciones se determinó que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre emulsificantes. Sin embargo, a simple vista se observa una diferencia entre emulsificantes, como en el caso de la lecitina y el Span 80:Tween 80 (Tabla 6). Lo anterior se atribuye a que al ser emulsiones polidispersas, que están en constante movimiento, la toma de fotografías se ve afectada y con ello, la homogeneidad entre repeticiones. Es por esto que la caracterización del tamaño de gota requiere de un análisis de distribución del tamaño de gota para determinar la frecuencia de diámetro. Dicho análisis de distribución se presenta en la Figura 11, observando que para las muestras elaboradas con Span 80, Lecitina y Tween 40, el tamaño de gota de mayor frecuencia ($\geq 60\%$) es el de 1-2 μm , mientras que las muestras elaboradas con Tween 80 presentan una mayor frecuencia ($\geq 60\%$) en diámetros entre 2-3 μm . Basado en la distribución de gota, la media de diámetro de gota (Tabla 6) muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras elaboradas con Span 80 ($1.80 \pm 0.07 \mu\text{m}$) de manera individual y las emulsiones que contenían Tween 80 (2.76 ± 0.11 y $2.64 \pm 0.20 \mu\text{m}$). Los valores encontrados indican que la emulsión formada es de tamaño micrométrico, similar a lo reportado para emulsiones de Span 80 con tamaño de gota de 1.5 μm (Drelich *et al.*, 2010).

McClements (2016) menciona que a altas concentraciones de gotas se obtienen muestras con mayor viscosidad. Esto se relaciona a lo que se observó en las emulsiones elaboradas con lecitina puesto a que en apariencia tenían mayor viscosidad e incluso el número de gotas presentes en la emulsión fue mayor que lo encontrado para los otros emulsificantes (Tabla 6). Lo anterior se debe a que la lecitina presenta una rápida adsorción en la interfaz, ocasionando una disminución en la tensión interfacial y una mayor formación de gotas de menor tamaño. Por su estructura, la fosfatidilcolina forma una fase laminar en la interfaz entre el aceite y el agua con monocapas y bicapas bien ordenadas, que es una de las características para

un bajo índice de cremado (Cabezas *et al.*, 2011). Sin embargo, el aspecto de las emulsiones obtenidas, relacionado con la viscosidad, se asemeja a una emulsión O/W, sumado a que existe una gran mayoría de estudios de emulsiones O/W que utilizan lecitina como emulsificante (Cabezas *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2017; Komaiko y McClements, 2015), a pesar de que los valores de HLB indican que sería eficaz para emulsiones W/O. Balcan *et al.* (2020) realizaron un estudio de emulsiones W/O y W/O/W en donde para su formación fue necesario utilizar lecitina con bajo contenido de fosfatidilcolina, por lo que al utilizar lecitina de soya sin modificar se favoreció la formación de una emulsión O/W y no una W/O, dándole características similares.

Por otro lado, las muestras que tuvieron un menor número de gotas y por lo tanto una mayor dispersión, fueron las elaboradas con Span 80: Tween 40, Span 80: Tween 80 y Tween 80. Esto indica que el uso de mezclas de emulsificantes es más efectivo para disminuir el tamaño de gota en una emulsión, Sin embargo, esto puede ser variable ya que por el movimiento de las gotas se dificulta la toma de fotografías en el microscopio y por ello no se puede elegir un emulsificante únicamente por el tamaño de gota obtenido.

El uso de cualquier emulsificante presenta ventajas y desventajas. Existen emulsificantes que son efectivos para generar pequeñas gotas debido a su rápida adsorción, pero son deficientes para proporcionar estabilidad a largo plazo ya que no proporcionan interacciones de repulsión lo suficientemente fuertes para evitar la agregación (Ogawa *et al.*, 2003). Es por esto que es necesario conocer características de estabilidad como el índice de cremado o la estabilidad en el color de los pigmentos.

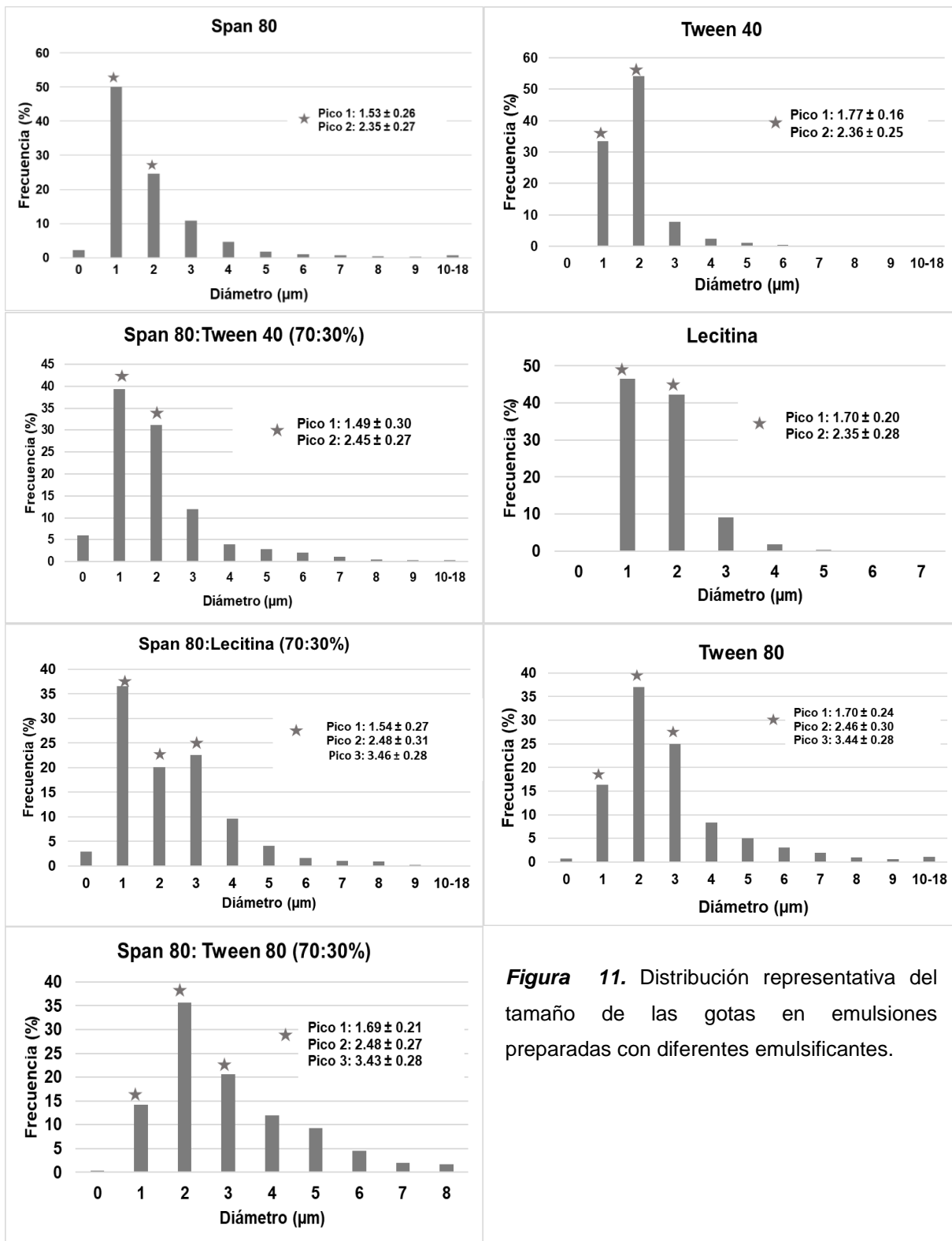


Figura 11. Distribución representativa del tamaño de las gotas en emulsiones preparadas con diferentes emulsificantes.

Balcaen *et al.* (2020) reportan emulsiones elaboradas con lecitina de soya y girasol con tamaños de gota entre 30-70 μm , mayor a lo que se encuentra en este estudio para muestras de lecitina de soya tanto individual como en mezcla con Span 80, teniendo diámetros de gota de $2.02 \pm 0.14 \mu\text{m}$ y $2.36 \pm 0.31 \mu\text{m}$, respectivamente. Esta diferencia se relaciona con el método de homogenización y al tipo de fase oleosa utilizada puesto a que al utilizar adicionalmente el ultrasonido se logra disminuir el tamaño de gota formado con el homogenizado (Ultra Turrax). Esta disminución se relaciona también con la viscosidad de la fase oleosa utilizada, ya que, a mayor viscosidad, mayor agregación de las gotas en la emulsión (Balcaen *et al.*, 2020). Al aumentar la temperatura, la viscosidad de las fases oleosas disminuye, lo que puede facilitar la ruptura de la interfase aceite-agua y conducir a la formación de gotitas más pequeñas (Saberri *et al.*, 2013). Es por esto, que en el presente estudio se utilizó homogenización, mediante uso de Ultra Turrax a 40-50°C para facilitar la disolución del emulsificante en la fase oleosa, teniendo en cuenta que a mayores temperaturas podría provocarse la inversión de fase por cambios en la geometría molecular y las características de solubilidad (deshidratación de sus grupos de cabeza hidrófilos) de los tensoactivos no iónicos (Saberri *et al.*, 2013).

Por otro lado, existen estudios que reportan emulsiones O/W formuladas con mezclas Span 80: Tween 80 que muestran gotas de tamaño nanométrico (60-120 nm) (Cho *et al.*, 2008; Ramisetty *et al.*, 2015). Caso contrario para el presente estudio en el que las emulsiones que contenían Tween 80 presentan el tamaño de gota más grande, por lo que se comprueba que el tipo de surfactante no es el único factor que influye en el tamaño de gota de las emulsiones. Factores como las condiciones de homogenización, concentración y tipo de emulsificante utilizado, además de la viscosidad del material, son responsables del tamaño medio de gota en emulsiones (McClements, 2016).

TABLA 6. Tamaño de gota en emulsiones con diferentes surfactantes.

Muestra	Diámetro (μm)	Diámetro DG (μm)	Log G/mL
Span 80	2.34 ± 0.26^a	1.80 ± 0.07^c	4.67 ± 0.15^b
Tween 40	2.37 ± 0.11^a	2.14 ± 0.12^{bc}	4.80 ± 0.12^b
Span 80: Tween40	2.49 ± 0.63^a	1.91 ± 0.13^{bc}	3.88 ± 0.17^c
Lecitina	2.19 ± 0.34^a	2.02 ± 0.14^{bc}	5.60 ± 0.14^a
Span 80: Lecitina	2.81 ± 0.63^a	2.36 ± 0.31^{ab}	4.53 ± 0.20^b
Tween 80	3.30 ± 0.21^a	2.76 ± 0.11^a	3.73 ± 0.18^c
Span 80: Tween 80	3.45 ± 0.86^a	2.65 ± 0.20^a	3.79 ± 0.16^c

* Media \pm desviación estándar (n=3). Valores con letra diferentes por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante prueba de Tukey. DG= Distribución de gota, G= Gota.

Respecto a la diferencia del tamaño de gota de los tensoactivos Tweens, la geometría molecular juega un papel importante en el desarrollo de las emulsiones. Esta se caracteriza por un parámetro de empaquetamiento (p), que es la relación entre las áreas de sección transversal efectivas del grupo de cola y el grupo de cabeza del tensoactivo. Dicho parámetro determina la curvatura óptima de una monocapa que forma el tensoactivo y que se relaciona con la estabilidad (McClements, 2016). El Tween 40 y el Tween 80 tienen grupos de cola polares similares, sin embargo, el Tween 40 tiene como grupo no polar el ácido láurico (C_{12}), mientras que el Tween 80 contiene ácido oleico (C_{18}) y al ser un ácido graso insaturado cuenta con estructura retorcida y afecta al empaquetamiento de las moléculas en la interfaz agua- aceite (Saberri y McClements, 2013). Se ha demostrado que el Tween 80 es efectivo en la disminución de gota en emulsiones O/W, pero al estar trabajando con formulaciones W/O las interacciones actúan de distinta manera. Las emulsiones con Span 80: Tween 40 tienen un HLB de 7.69, mientras que la mezcla con Tween 80 tiene un HLB de 7.51. Li *et al.* (2018) demostraron que el tamaño de gota de las emulsiones O/W elaboradas con Tween 80/Span 80 estaba inversamente relacionado con la hidrofobicidad del tensoactivo, es decir, un valor de HLB más bajo tiene una mayor hidrofobicidad y con ello un mayor tamaño de gota.

6.3.3 Estabilidad de emulsiones.

La estabilidad de las emulsiones se midió en función al índice de cremado, siendo este el que indica la separación de fases. Para todas las emulsiones que fueron almacenadas justo después de su preparación a 4°C durante 24h, no existe separación, atribuido a que a temperaturas menores de 25°C el aceite de coco se encuentra en estado sólido por su alto punto de fusión y con esto se favorece la estabilidad de la emulsión (Dhamodharan *et al.*, 2020). Sin embargo, al colocar las emulsiones a temperatura ambiente durante un tiempo de 2h, se observa como todas las emulsiones presentan separación de fases (Figura 12).

Como se había mencionado, una de los procesos por el cual las emulsiones pierden estabilidad se denomina cremado/sedimentación. Las gotas en una emulsión tienen densidad diferente al líquido que las rodea, si la densidad de las gotas es más baja, tienen tendencia a moverse hacia arriba y eso se conoce como crema. Por el contrario, si la densidad es más alta, las gotas tienden a moverse hacia la parte inferior, llamándole sedimentación (McClements, 2016). En este caso, las gotas de agua dispersas en el aceite, al tener una densidad mayor, sedimentan, tal como se observa en la Figura 12.

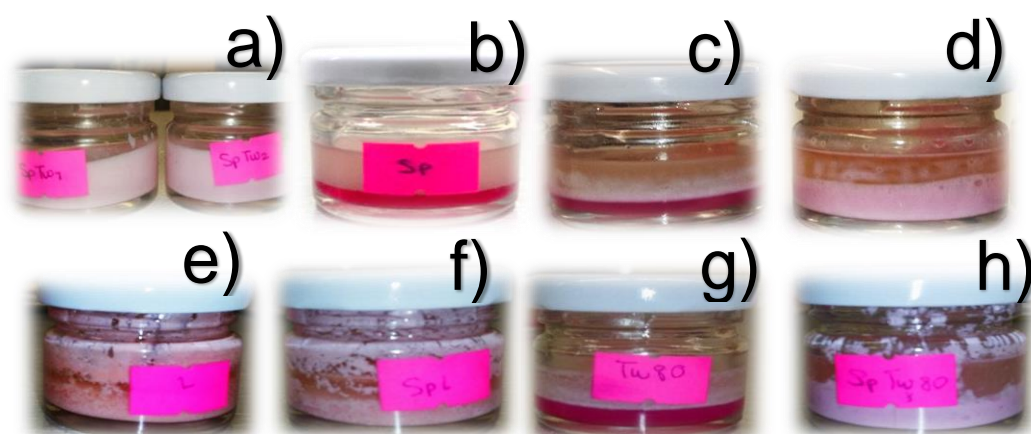


Figura 12. Separación en emulsiones con diferentes surfactantes (2h-25°C). a) Muestras a 4°C después de 24h, b) Span 80, c) Tween 40, d) Span 80: Tween40, e) Lecitina, f) Span 80: Lecitina, g) Tween 80, h) Span 80: Tween 80.

En los resultados obtenidos para índice de cremado (Figura 13) se encontró que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras elaboradas con Span 80, Tween 40 y Tween 80, y las muestras elaboradas con Lecitina, Span 80: Tween 40, Span 80: Tween 80 y Span 80: Lecitina. La mayor separación se tiene en las muestras que contenían emulsificantes individuales, a excepción de las muestras con lecitina. En la Figura 12 se observa como en estas muestras la separación de fases es completa, dejando el extracto de betalaínas expuesto. En el caso de los surfactantes no iónicos Tweens el resultado concuerda con el hecho de que estos emulsificantes poseen un HLB alto, lo que quiere decir que favorecen la formación de emulsiones O/W, por lo que tanto las condiciones de procesamiento como las formulaciones no favorecen la formación de la emulsión. En el caso de las emulsiones que contenían Tween 80 se puede observar una relación entre el tamaño de gota y la sedimentación, ya que la separación de fases ocurrió 30 min después de su elaboración, en donde, las gotas de más grandes tienden a sedimentar con mayor rapidez que las gotas pequeñas (McClements, 2016).

Por otro lado, el HLB del Span 80 debería favorecer la formación de emulsiones W/O, sin embargo, se observa también una separación completa, atribuido a la alta hidrofobicidad del emulsionante debido a su estructura. Al tener un mayor grado de esterificación, el valor de HLB disminuye y esto le confiere una mayor solubilidad en materiales lipofílicos. Esta característica hace que se reduzca la formación de enlaces hidrófilos, minimizando así la propiedad anfifílica y, por lo tanto, afectar la estabilidad (El Zaafarany *et al.*, 2010). Otro de los factores que pudo influir en la separación de fases fue el aumento de temperatura, situación que reportan Tang y Sivakumar (2012) en donde a mayor exposición a ultrasonido, menor la elasticidad interfacial, es decir, se pierde estabilidad. Esto es atribuido a que al aumentar la temperatura a más de 50°C, ocurren cambios en la composición de ácidos grasos insaturados en la longitud de la cadena de alquilo, lo que afecta el carácter hidrofílico del emulsionante.

En relación a lo anterior, existen más estudios de emulsiones elaboradas con mezclas de Span 80 y algún surfactante hidrofílico, que utilizando el Span 80 de forma individual. Considerando entonces, que es un emulsificante que tiene cambios durante su procesamiento lo que no es deseable en las emulsiones. Se han estudiado emulsiones estables de Span 80 con Tween 80 (Porrás *et al.*, 2008) y Span 80 + Tween 40 y Tween 20, utilizados para inversión de fases (Lv *et al.*, 2014). Resultados similares se encontraron en este estudio, donde las mezclas con Span resultaron con mayor estabilidad, atribuido a que las mezclas de emulsificantes permiten tener un balance de HLB con mayor equilibrio, en el caso de Tween 40 y Tween 80 por su carácter hidrofílico y el Span 80 con carácter hidrofóbico permiten tener una mejor interacción con las fases, disminuyendo la tensión interfacial.

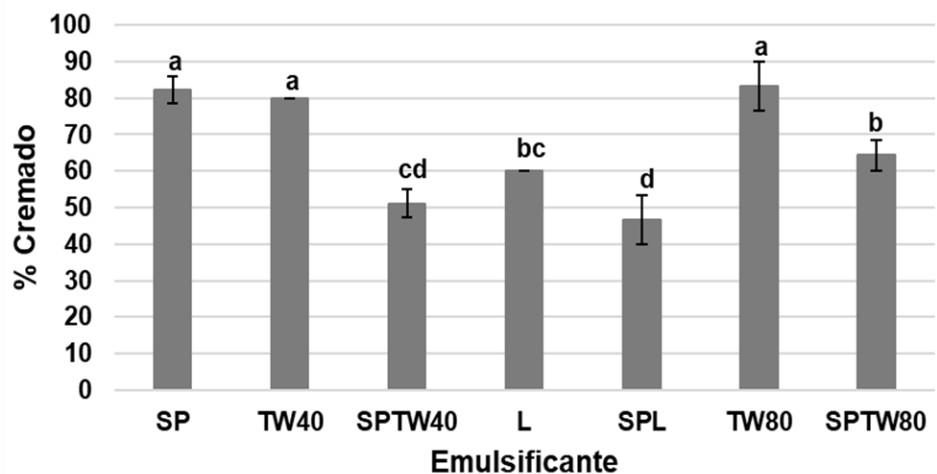


Figura 13. Resultados de índice de cremado (%) para emulsiones con diferentes emulsificantes.

Media \pm desviación estándar (n=3). Columna con letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante prueba de Tukey. SP= Span 80, TW40= Tween 40, SPTW40= Span 80:Tween 40
L= lecitina, SPL= Span 80: Lecitina, TW80= Tween 80, SPTW80= Span 80:Tween 80.

En el caso de las emulsiones estabilizadas con lecitina se pudo observar la presencia de gránulos y un mayor espesor de la mezcla, es decir, era menos fluida y no presentaba homogeneidad. Balcaen *et al.* (2020) mencionan que las características obtenidas en una emulsión W/O estabilizada con lecitina dependen del tipo de lecitina y de fase oleosa utilizada. Lo anterior se relaciona con la geometría molecular que adopta la lecitina según la naturaleza hidrofóbica. En el caso de la lecitina de soya, al tener un alto grado de fosfatidilcolina (dos cadenas de ácidos grasos) tiende a tener una geometría cercana a la cilíndrica y se organiza en emulsiones W/O en estructuras estables como liposomas (McClements, 2016). La importancia de esto es que su carácter hidrofóbico es menor y trabaja a valores de HLB más altos, por lo tanto, la estabilidad de emulsiones W/O es más baja.

En diversos estudios se ha encontrado que la formación de emulsiones W/O con cualquier tipo de lecitina se ve favorecido en fases oleosas con ácidos grasos de cadena media. Mientras que con ácidos grasos de cadena larga es necesario utilizar lecitina con un bajo grado de fosfatidilcolina para disminuir su hidrofobicidad (Knoth y Muschiolik, 2005; Balcaen *et al.*, 2020). Knoth y Muschiolik (2005) encontraron que en las emulsiones elaboradas con aceites de ácidos grasos de cadena larga, las gotas de agua en la emulsión estaban altamente agregadas, no solo en gotas esféricas, si no lo que parecían ser grumos. Este estado puede ser causado por el exceso de ácidos grasos, lo que favorece la agregación. En el presente estudio el número de gotas encontradas en las emulsiones que contenían lecitina, fue mayor a lo encontrado para otros emulsificantes y se observó agregación entre gotas. Sin embargo, este resultado difiere con la estabilidad observada en el índice de cremado, lo cual podría estar relacionado con que la alta floculación retrasa la formación de crema, al formar una red tridimensional de flóculos agregados que evita que las gotas individuales se muevan y pierdan su estructura.

6.3.4 Evaluación de color.

El objetivo de la elaboración de emulsiones en este estudio es la protección de las betalaínas presentes en la fase acuosa. En la Tabla 7 se muestran los resultados de los parámetros de color al día 0, así como siete días después de la elaboración, para determinar el efecto del almacenamiento. En el parámetro L^* (luminosidad), al día 0 se tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras elaboradas con lecitina y el resto de los emulsificantes, teniendo una mayor luminosidad en las muestras con lecitina. Al día siete se observa una disminución de la luminosidad para las muestras con lecitina, mientras que para las muestras con el resto de los emulsificantes se tiene un incremento. Lo anterior atribuido a la separación de fases y al almacenamiento ya que el aceite de coco de manera individual, a temperaturas bajas tiene una luminosidad alta.

TABLA 7. Parámetros de color en emulsiones elaboradas con diferentes surfactantes.

Muestra	L^*	L^*_7	a^*	a^*_7	b^*	b^*_7
Span 80	52.36 ± 2.36 ^{cd}	53.28 ± 1.78 ^c	13.14 ± 0.82 ^a	11.42 ± 0.88 ^{bcd}	-0.85 ± 0.20 ^c	-0.97 ± 0.86 ^c
Tween 40	48.15 ± 2.40 ^d	53.22 ± 2.33 ^c	13.90 ± 3.75 ^a	12.06 ± 1.11 ^{abc}	-3.75 ± 0.32 ^d	-2.23 ± 0.42 ^{cd}
Span 80: Tween40	48.90 ± 3.51 ^{cd}	66.53 ± 1.13 ^a	12.94 ± 1.88 ^a	12.69 ± 0.19 ^{abc}	-3.34 ± 0.22 ^d	-2.96 ± 0.21 ^d
Lecitina	61.80 ± 3.48 ^b	60.85 ± 1.61 ^b	11.67 ± 1.73 ^a	9.48 ± 0.38 ^d	6.69 ± 0.89 ^a	7.52 ± 0.33 ^a
Span 80: Lecitina	68.65 ± 0.32 ^a	45.76 ± 1.77 ^d	15.50 ± 0.26 ^a	10.27 ± 0.44 ^{cd}	1.48 ± 0.09 ^b	2.04 ± 0.21 ^b
Tween 80	47.91 ± 0.48 ^d	57.05 ± 1.47 ^d	15.74 ± 1.55 ^a	13.35 ± 1.57 ^{ab}	-3.44 ± 0.48 ^d	-1.51 ± 0.28 ^{cd}
Span 80: Tween 80	55.25 ± 0.84 ^c	63.63 ± 3.39 ^d	14.34 ± 2.63 ^a	13.93 ± 0.80 ^a	-4.50 ± 0.42 ^d	-2.17 ± 1.01 ^{cd}

Media \pm desviación estándar (n=3). 7 = indica emulsión almacenada por 7 días. Valores con letra diferentes por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante prueba de Tukey. Valores sombreados indican diferencia significativa entre el día 0 y el día 7, mediante prueba de t-pareada.

Por otro lado, el parámetro a^* muestra una tendencia a la coloración roja, relacionado con el contenido de betacianinas en la emulsión. Justo después de la elaboración las muestras no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$), sin embargo, siete días después de su elaboración se presenta diferencia significativa en las muestras elaboradas con lecitina, teniendo una disminución del parámetro a^* , atribuida a la

degradación de los pigmentos. En el parámetro b^* se puede observar que para las muestras elaboradas con lecitina se tiene una tendencia a la coloración amarilla, relacionada con el color natural del tensoactivo. Mientras que para el resto de los emulsificantes se tiene una tendencia a la coloración azul, correspondiente al bajo contenido de betaxantinas presentes en el garambullo. Esto anterior indica que existe una mayor estabilidad en el color, específicamente en el parámetro a^* para las muestras que no contienen lecitina, siendo esto lo que se busca en las emulsiones.

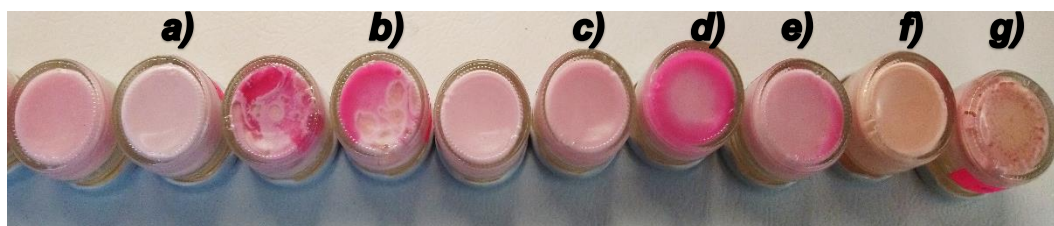


Figura 14. Color en muestras de emulsiones a) Span 80, b) Tween 40, c) Span 80: Tween 40, d) Tween 80, e) Span 80: Tween 80, f) Lecitina, g) Span 80: Lecitina.

6.4 Efecto de la potencia y tiempo de sonicación en emulsiones simples.

En base a los resultados obtenidos en la fase anterior, se decidió elaborar emulsiones simples utilizando mezcla de emulsificantes Span 80: Tween 40 (70:30), siendo esta la mezcla con la que existía menor separación de fases ($IC \approx 50\%$), sin alteración del parámetro a^* de color. Las emulsiones simples se formularon con Span 80: Tween 40 (70:30), extracto de betalaínas (10%) y mezcla de aceite de canola y coco (50:50), todo esto en relación 5:25:70. Estas emulsiones se elaboraron con 30,50 y 70 % de amplitud de sonicación, lo que corresponde a 935, 1700 y 2695 W/L, respectivamente. Se utilizaron variaciones en el tiempo de sonicación de 1,2 y 3 min, basando los límites en los resultados de las cinéticas de intensidad, en donde a amplitudes más altas y tiempos más largos se observaba separación total de las fases. Las emulsiones obtenidas en esta fase fueron evaluadas en su morfología, tamaño de gota, color e índice de cremado.

6.4.1 Morfología de gota.

Las emulsiones presentan una morfología esférica en la que se puede observar el color rosa al centro (Figura 15), atribuido a los pigmentos encapsulados. Las esferas se presentan de distintos tamaños, teniendo una alta dispersión. Para las muestras elaboradas con una amplitud de 50% ($I=1700$ W/L) se observan esferas poco homogéneas, en el interior de ellas no es claro el contenido y a simple vista se percibe un tamaño de gota mayor. Mientras que las muestras elaboradas con 30% y 70% (935 W/L y 2695 W/L) se presentan con mayor claridad, de tamaños y formas homogéneos. Estos resultados indican que la morfología y el tamaño de gota están relacionados con la intensidad del ultrasonido y esto puede explicarse con el proceso de cavitación. El número de burbujas de cavitación está dado por la intensidad acústica durante la sonicación. Una mayor intensidad tendrá un mayor número de cavidades y con ello la deformación y ruptura de gotas grandes en pequeñas (Iqbal *et al.*, 2014; Entezari y Ghows, 2011). Sin embargo, como se muestra en la Figura 15, con una amplitud de 50 % ($I=1700$ W/L) se tiene menos homogeneidad que al utilizar 30% (935 W/L) y 70% (2695 W/L), e incluso en los tiempos de ultrasonido de 2 y 3 min, también existe una diferencia en la dispersión de las gotas. Lo que indica que existe una intensidad optima en la que las gotas tendrán su menor tamaño y una dispersión homogénea. Resultados similares se obtuvieron por Entezari y Ghows (2011), en donde al aumentar la intensidad de ultrasonido de 35 a 45 W, el área de superficie de nanopartículas se incrementó y al llegar a 58 W se observó una disminución, atribuido a la coalescencia de gotas que flotaban en la superficie del líquido lo que llevaba a necesitar mayor energía para romperlas. Lo anterior es relacionado también con el aumento de temperatura y la disminución de viscosidad. La cavitación provoca ondas de choque y calentamiento local, que en el caso del aceite de coco, tiene influencia en la viscosidad, lo que conlleva a una agregación parcial de las gotas, necesitando mayor energía para disminuir su tamaño (Li *et al.*, 2019).

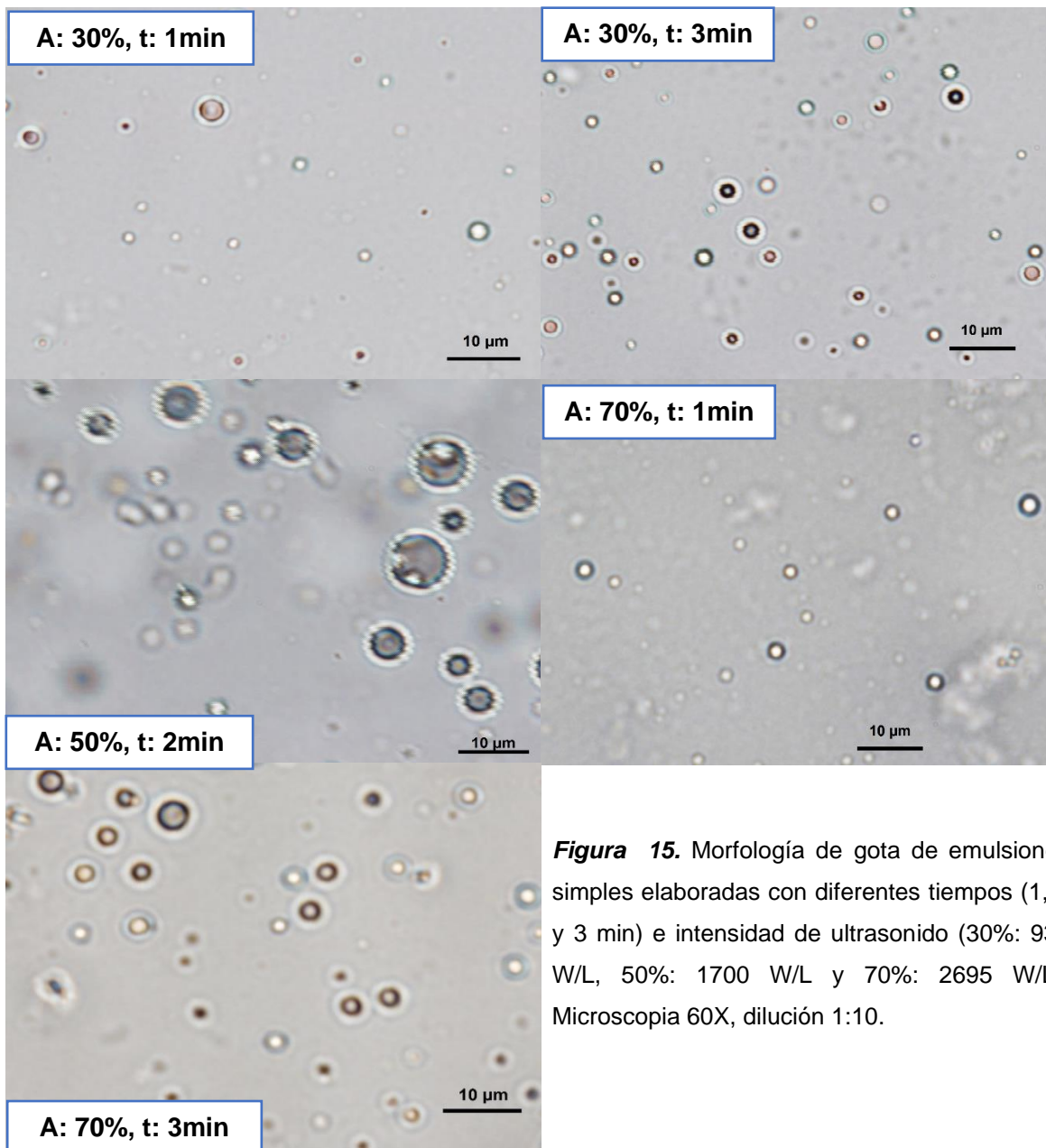


Figura 15. Morfología de gota de emulsiones simples elaboradas con diferentes tiempos (1, 2 y 3 min) e intensidad de ultrasonido (30%: 935 W/L, 50%: 1700 W/L y 70%: 2695 W/L). Microscopia 60X, dilución 1:10.

6.4.2 Tamaño de gota, índice de cremado y parámetros de color.

Como se había mencionado anteriormente, la sonicación, mediante la cavitación, tiene influencia en la disminución del tamaño de gota y con ello en las diferentes características de las emulsiones. En la Tabla 8 se observa el análisis de varianza obtenido para el diseño factorial en muestras de emulsiones simples. En el caso del tamaño de gota, con una R^2 de 93% se encontró un efecto significativo ($p < 0.05$) por el tiempo de sonicación y por la curvatura del modelo. En la Figura 16, se observa como en el punto central, en este caso a una amplitud de 50% y un tiempo de 2 min, se tiene el mayor tamaño de gota, mientras que en los extremos el diámetro disminuye. Los valores de diámetro obtenidos van desde 1.96 ± 0.08 hasta $3.04 \pm 0.05 \mu\text{m}$. Las muestras a las que se les aplicó un minuto en el equipo de ultrasonido muestran el menor tamaño de gota, tanto en amplitud del 30% como en la del 70%. Esta diferencia provocada por el tiempo de procesamiento puede deberse a que se alcanza un estado estable en el que ya no es posible disminuir el tamaño de gota sin llegar al sobreprocesamiento (Xiong *et al.*, 2019).

Resultados similares se reportan por Vélez-Erazo *et al.* (2018), quienes elaboraron emulsiones simples utilizando concentrado de proteína de suero y observaron que las emulsiones procesadas a una amplitud del 50% presentaron los diámetros de gota más grandes, al igual que las tratadas a 75% durante 2, 4, 6 y 15 min y las procesadas a 100% durante 15 min. Mientras que en las emulsiones tratadas durante 10 min se observó una disminución significativa en el tamaño de gota. Sin embargo, las emulsiones tratadas a 75 % durante 2 min, tenían mayor estabilidad de fase a las 24 horas de preparación, por lo que la amplitud no era un factor decisivo en la estabilidad y tamaño de gota de las emulsiones, si no que estaba relacionado con el tiempo de procesamiento.

Dicho de otra manera, es posible obtener el mismo diámetro de gota con diferentes combinaciones de tiempo y potencia, pero esto no asegura la estabilidad de la emulsión. El procesamiento excesivo de la muestra puede estar relacionado con que la tasa de formación de gotas es más rápida que la tasa de adsorción del emulsificante, logrando que el emulsificante no cubra la interfaz y que el resto de la energía sea disipada en forma de calor. También puede deberse al aumento en el tiempo de sonicación ya que la energía a la que es sometida la emulsión provoca que las gotas vuelvan a chocar, conduciendo a la ruptura y agregación y con ello a un aumento en el diámetro. Así como el aumento de la temperatura, ocasionado por la cavitación que puede generar una agregación parcial de las gotas en la emulsión (Vélez- Erazo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). En el presente proyecto, el hecho de que a una amplitud del 70% se logre un tamaño de gota similar al de 30% no quiere decir que las características de estabilidad de la emulsión sean iguales, es decir, los efectos del ultrasonido estarán dadas por las variables en forma individual y no en conjunto, por lo que debe evaluarse su comportamiento a través del tiempo.

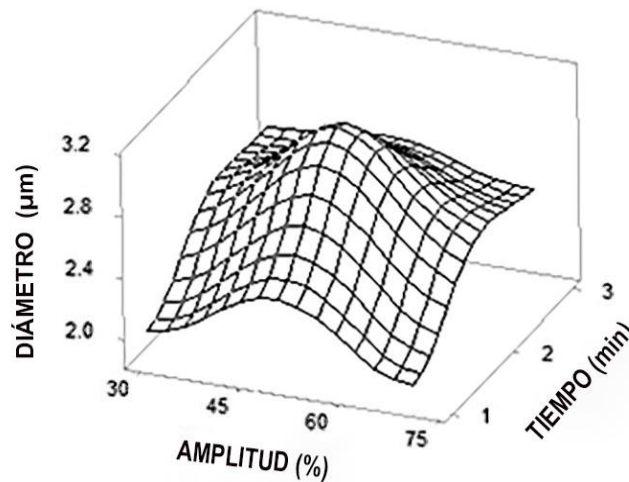


Figura 16. Gráfico de superficie de respuesta para diámetro de gota de emulsiones simples.

TABLA 8. Análisis de varianza (Suma de cuadrados) para el tamaño de gota, índice de cremado y los parámetros de color de las muestras de emulsiones simples.

Fuente	DF	D (µm)	IC (%)	L*	a*	b*	L* ₇	a* ₇	b* ₇
Modelo	4	1.63*	8125.53*	315.64*	21.29*	5.30	131.51*	15.20	1.27
Amplitud (A)	1	0.02	6945.15*	268.81*	1.30	0.88	110.76*	1.21	0.76*
Tiempo (t)	1	0.47*	312.50*	3.34	0.70	2.17*	1.43	6.47	0.35
A*t	1	0.00	312.50*	28.38*	3.02	1.91*	14.83	0.39	0.03
Curvatura	1	1.13*	555.38*	15.12	16.27*	0.34	4.48	7.14*	0.12
Error	1	0.12	80.39	14.39	4.97	1.45	13.64	5.99	0.42
Total	5	1.75	8205.92	330.03	26.26	6.75	145.14	21.20	1.68
R²	9	0.93	0.98	0.95	0.81	0.78	0.90	0.71	0.75

*Efecto significativo ($p < 0.05$). R^2 = Coeficiente de correlación. 7 = indica emulsión almacenada por 7 días, DF=grados de libertad, D= diámetro de gota, IC= índice de cremado.

Una de las variables que permite evaluar la estabilidad de las emulsiones es el índice de cremado, este se debe a las diferentes densidades de las fases de la emulsión y proporciona información sobre el grado de agregación y separación de las gotas. En este caso se obtuvieron valores de índice de cremado entre 0 y 72%, siendo las muestras elaboradas con amplitud de 70% y 1 min de sonicación las que presentan mayor separación de fase. El análisis de varianza con una R^2 de 98%, indica un efecto significativo ($p < 0.05$) en la amplitud, tiempo de ultrasonido, así como en la curvatura y su interacción (Tabla 8). En la Figura 17 se observa como el aumento de la amplitud y el tiempo de procesamiento son directamente proporcionales al índice de cremado. Esto se relaciona con lo mencionado anteriormente sobre el sobreprocesamiento de la muestra, a mayor intensidad de ultrasonido, existe una agregación de gotas que provocan la ruptura de la emulsión. Esta agregación puede deberse a la formación rápida de burbujas pequeñas, que al no mezclarse con el emulsificante no permiten la encapsulación del compuesto bioactivo y por otro lado, el aumento de la temperatura, propio de la cavitación, puede llegar a desestabilizar el sistema (Vélez-Eraza *et al.*, 2018). Por lo tanto, para este sistema en específico, las muestras que presentan mayor

estabilidad (Índice de cremado de 0%) son las tratadas con una amplitud del 30% y un tiempo de procesamiento de un minuto, siendo esto una ventaja al momento de utilizar pigmentos ya que se disminuye el riesgo de perder los compuestos en el procesamiento.

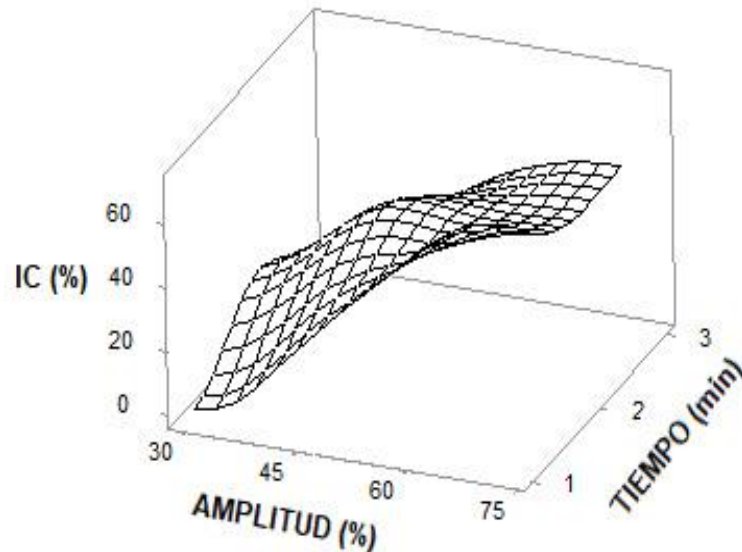


Figura 17. Gráfico de superficie de respuesta para índice de cremado de emulsiones simples.

Al estar trabajando con encapsulación de pigmentos, el color es una de las variables en las que se busca mayor estabilidad al realizar emulsiones. En este caso, se obtuvieron emulsiones con un parámetro de color L^* entre 63.00 ± 2.45 y 78.36 ± 1.90 . El análisis de varianza muestra un efecto significativo en la amplitud y en su interacción con el tiempo (Tabla 8), teniendo una R^2 de 95%. Este efecto se observa en la Figura 18, en donde, al incrementar la amplitud, la luminosidad de las muestras disminuye. Lo anterior se puede relacionar con la pérdida de estabilidad de las emulsiones.

Calva-Estrada *et al.* (2017) estudiaron la encapsulación de carotenos en emulsiones simples (O/W) utilizando ultrasonido y homogenización de alta presión. En este estudio se menciona que existe una menor cromaticidad y luminosidad en las muestras tratadas con ultrasonido, asociado al aumento del tamaño de las gotas y con la

distribución del tamaño de gota. En este caso, a pesar de que existe un menor tamaño de gota en las emulsiones tratadas con una amplitud del 70%, la distribución del tamaño de gota es menos homogénea, por lo que esto puede influir también en la disminución de luminosidad.

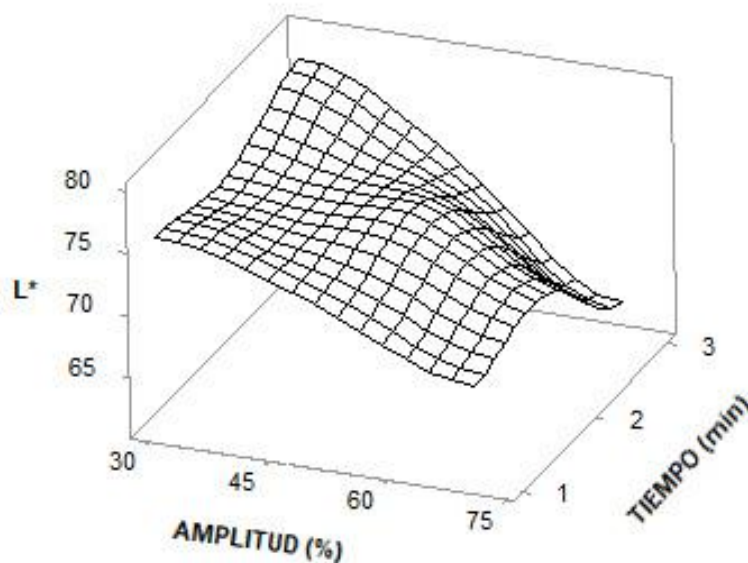


Figura 18. Gráfico de superficie de respuesta para parámetro L^* de emulsiones simples.

Por otro lado, los valores para el parámetro a^* se encontraban entre 15.32 ± 0.11 y 19.83 ± 0.01 . El análisis de varianza con una R^2 de 81%, muestra un efecto significativo únicamente en la curvatura del modelo (Tabla 8). Esto quiere decir que no existe una variación en la coloración rojo/rosa por ninguna de las variables estudiadas, siendo esto favorable para la preservación de los pigmentos. En la Figura 19 se observa como en la amplitud del 50%, siendo este el punto central, se obtiene el valor mayor para el parámetro a^* , atribuido a la inestabilidad de la emulsión y la baja encapsulación del extracto de betalaínas, lo que hizo que predominara esa coloración.

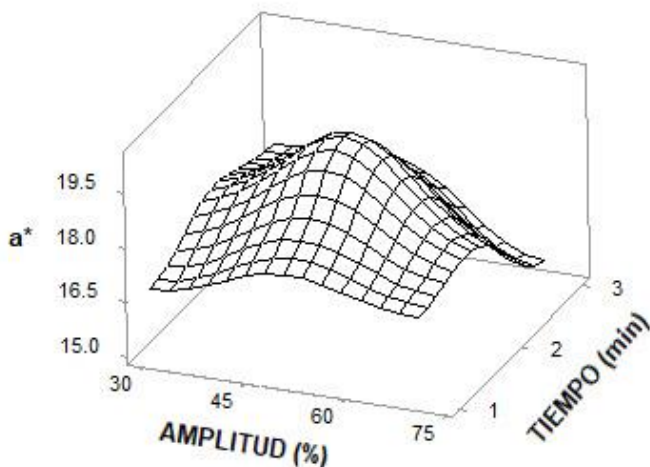


Figura 19. Gráfico de superficie de respuesta para parámetro a^* de emulsiones simples.

El parámetro de color b^* , con tendencia al amarillo, puede estar relacionado a diferentes factores, uno de ellos es el contenido de betacianinas presentes en el extracto. Sin embargo, también puede deberse al color característico del aceite de canola, así como al de los emulsificantes utilizados. En las emulsiones analizadas se encontraron valores de b^* entre -2.82 ± 0.03 y -0.80 ± 0.05 . El análisis de varianza ($R^2=78\%$) muestra una diferencia significativa en el tiempo de ultrasonido y su interacción con la amplitud (Tabla 8). Existe una tendencia en la coloración azul para todas las muestras, que como se había mencionado en la sección 6.1, el extracto de garambullo presenta esa característica por la poca cantidad de betaxantinas. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 20, existe un aumento en el parámetro b^* , es decir, un aumento en la coloración amarilla o en la opacidad de la muestra (valores cercanos a 0), que podría estar relacionada a la degradación de betalaínas o a la agregación de los glóbulos de aceite. Las variaciones que pueden tenerse en los parámetros de color a^* y b^* están directamente relacionados a lo que ocurre con el parámetro L^* (Tiwari *et al.*, 2010). Por lo que, en este caso, la pérdida de luminosidad, que se debe a la inestabilidad de la emulsión, estará directamente relacionada con los cambios que ocurran en el parámetro b^* .

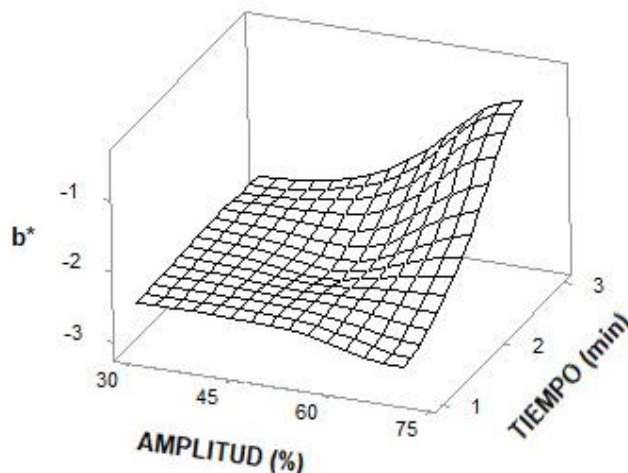


Figura 20. Gráfico de superficie de respuesta para parámetro b^* de emulsiones simples.

Para evaluar la estabilidad del color en las emulsiones se realizaron mediciones 7 días después de su elaboración, obteniendo con el análisis de varianza la misma tendencia que al día de la elaboración (Figura 21), en la que existe un efecto significativo para la amplitud de ultrasonido en los parámetros de color L^* y b^* (Tabla 8). Al hacer una comparación del día 0 y el día 7 se obtuvo que para el parámetro L^* , las muestras que fueron tratadas con un tiempo de 3 min tuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$), aumentando la luminosidad, mientras que el parámetro a^* no presenta diferencias. Por otro lado, para el parámetro b^* , las emulsiones tratadas con 30%- 3min y 70%-1 min muestran una disminución de la coloración azul. Estos cambios se atribuyen a la degradación de betalaínas, ya sea por baja encapsulación o por liberación en almacenamiento.

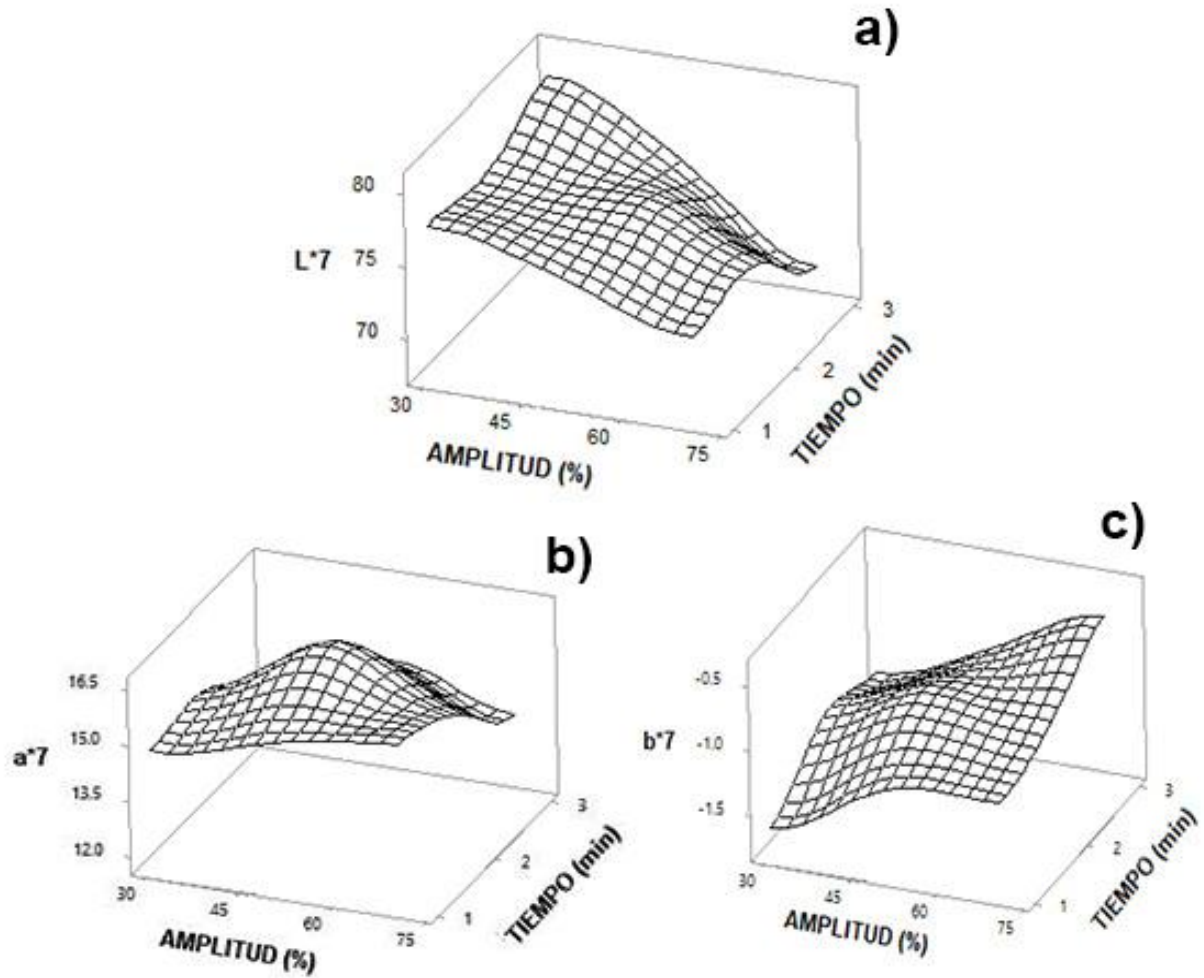


Figura 21. Gráfico de superficie de respuesta para parámetros de color al día 7. a) Parámetro L^*7 , b) Parámetro a^*7 , c) Parámetro b^*7 .

TABLA 9. Evaluación de color en emulsiones simples Dia 0/Dia 7.

Muestra	Día	L	a*	b*
30% -1 min	0	75.88 ± 0.81 ^A	16.72 ± 0.92 ^{AB}	-2.50 ± 0.66 ^A
	7	77.57 ± 0.38 ^a	14.75 ± 0.44 ^a	-1.61 ± 0.20 ^a
30% -3 min	0	78.36 ± 1.90 ^A	17.36 ± 0.48 ^{AB}	-2.44 ± 0.50 ^A
	7	79.45 ± 1.85 ^a	13.40 ± 2.25 ^a	-1.31 ± 0.51 ^a
50% -2 min	0	74.40 ± 1.38 ^{AB}	19.83 ± 0.75 ^A	-2.60 ± 0.69 ^A
	7	76.46 ± 2.21 ^a	16.57 ± 0.01 ^a	-0.88 ± 0.10 ^a
70% -1min	0	68.06 ± 1.48 ^{BC}	17.15 ± 1.79 ^{AB}	-2.82 ± 0.10 ^A
	7	72.85 ± 0.47 ^{ab}	15.97 ± 0.69 ^a	-1.11 ± 0.05 ^a
70% -3min	0	63.00 ± 2.45 ^C	15.32 ± 0.23 ^B	-0.80 ± 0.50 ^A
	7	69.28 ± 2.23 ^b	13.73 ± 0.52 ^a	-0.57 ± 0.30 ^a

*Media ± desviación estándar (n=2). Valores sombreados indican efecto significativo ($p < 0.05$) mediante prueba de t-pareada. Comparaciones de medias por columna, por día. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante prueba de Tukey (Letra mayúscula para Dia 0 y letra minúscula para Dia 7).

6.5 Evaluación de emulsiones dobles (W/O/W).

Las emulsiones dobles son una alternativa que puede dar mayor protección a los pigmentos. Sin embargo, su estabilidad dependerá de la concentración, tiempo e intensidad de sonicación. En este caso se realizaron emulsiones con amplitudes de 30, 50 y 70%. Para conocer la intensidad real de sonicación se realizaron cinéticas de la misma manera que en las emulsiones simples, sin embargo, se modificó la concentración de la fase acuosa y fase oleosa según la composición de las emulsiones dobles. Las intensidades obtenidas fueron de 954, 1257, 2070 W/L (13.84, 18.22 y 30 W), para 30,50 y 70% respectivamente. Al comparar con las emulsiones simples (935, 1700 y 2695 W/L), se puede observar que, al utilizar la mezcla de emulsiones dobles, siendo 70 % fase acuosa y 30% emulsión simple, la intensidad dada por el ultrasonido a altas amplitudes, es menor que en las emulsiones simples, lo que tendría impacto en las características finales de la emulsión. Esta diferencia en la intensidad de ultrasonido está relacionada con sus mayores viscosidades debido a la concentración

de fase oleosa en las emulsiones simples, lo que dificulta la propagación de las ondas ultrasónicas y, por ende, el fenómeno de cavitación acústica (Abbas *et al.*, 2013).

Como se ha mencionado, existen muy pocos estudios de emulsiones W/O y W/O/W, y la potencia e intensidad de sonicación dependerá del volumen y formulación utilizada. Silva *et al.* (2020) utilizaron una intensidad de ultrasonido de 852.72 W/L (A= 35%) para emulsiones de 10 mL durante 60 s, siendo esto similar a lo reportado en este estudio. Por otro lado, Vélez- Erazo *et al.* (2018) estudiaron la producción de 250 mL de emulsiones simples y dobles de aceite de chía (O/W/O) utilizando una amplitud de sonicación de 50, 70 y 100% lo que correspondía a una potencia de 63.2 W, 94.4 W y 131.8 W (252.8, 377.6 y 527.2 W/L) respectivamente, muy por debajo de lo reportado para este estudio. La diferencia entre intensidades puede deberse al volumen de la muestra, el material del contenedor, la temperatura y la formulación de la emulsión.

6.5.1 Morfología de gota.

A diferencia de las emulsiones simples, en las emulsiones dobles se observa que dentro de la esfera de encapsulación se encuentran esferas más pequeñas (Figura 22). La fase acuosa es la fase externa, luego se observa un aro en el centro que corresponde a la parte oleosa y al fondo un punto de color rosa que indica la encapsulación del extracto de betalaínas. La movilidad de estas gotas es mucho mayor a la presentada para emulsiones simples e incluso a simple vista se observan gotas más pequeñas que no logran ser captadas en la fotografía. Lo anterior atribuido a que la fase acuosa ahora es predominante y eso permite una mayor dispersión. Como se puede observar en la Figura 22, las emulsiones que tienen mayor tendencia a formar capsulas en las que dentro se encuentren gotas pequeñas son las elaboradas con amplitudes mayores o iguales al 50%, así como en las concentraciones más altas. Sin embargo, debido a la movilidad de las gotas en dispersión, no podría considerarse como factor para seleccionar la emulsión con mayor estabilidad, por lo que deben considerarse otros aspectos como índice de cremado y color.

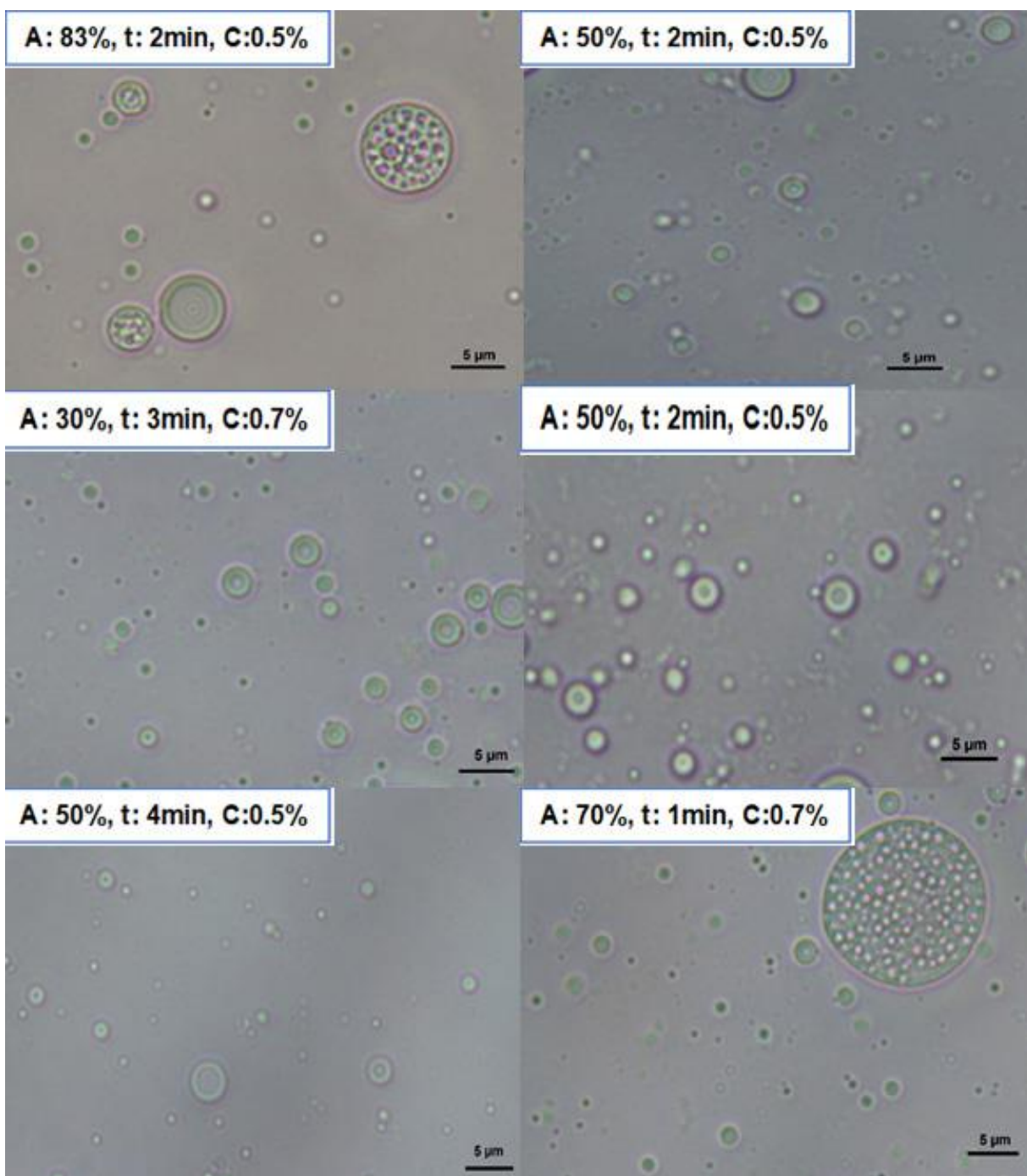
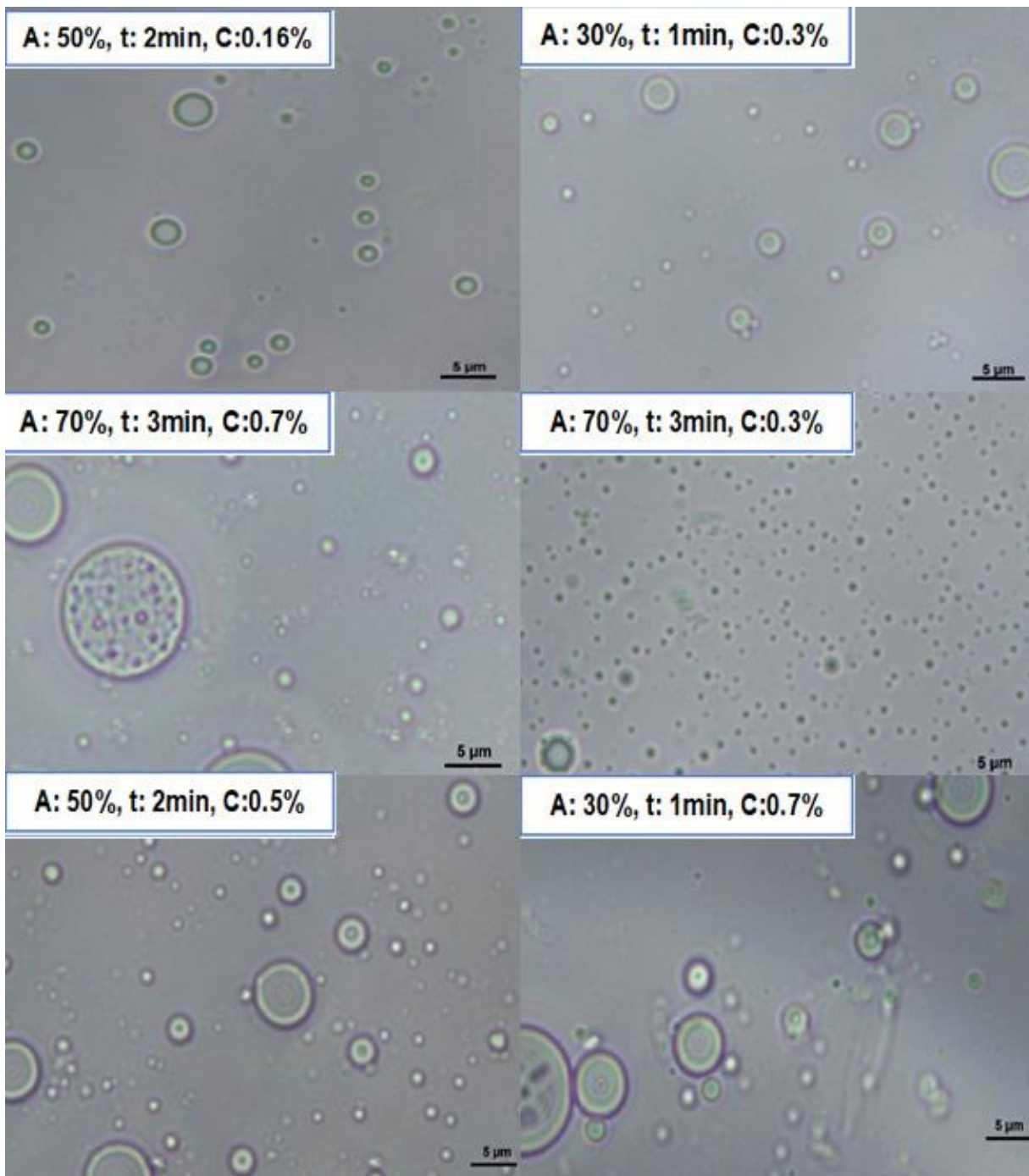
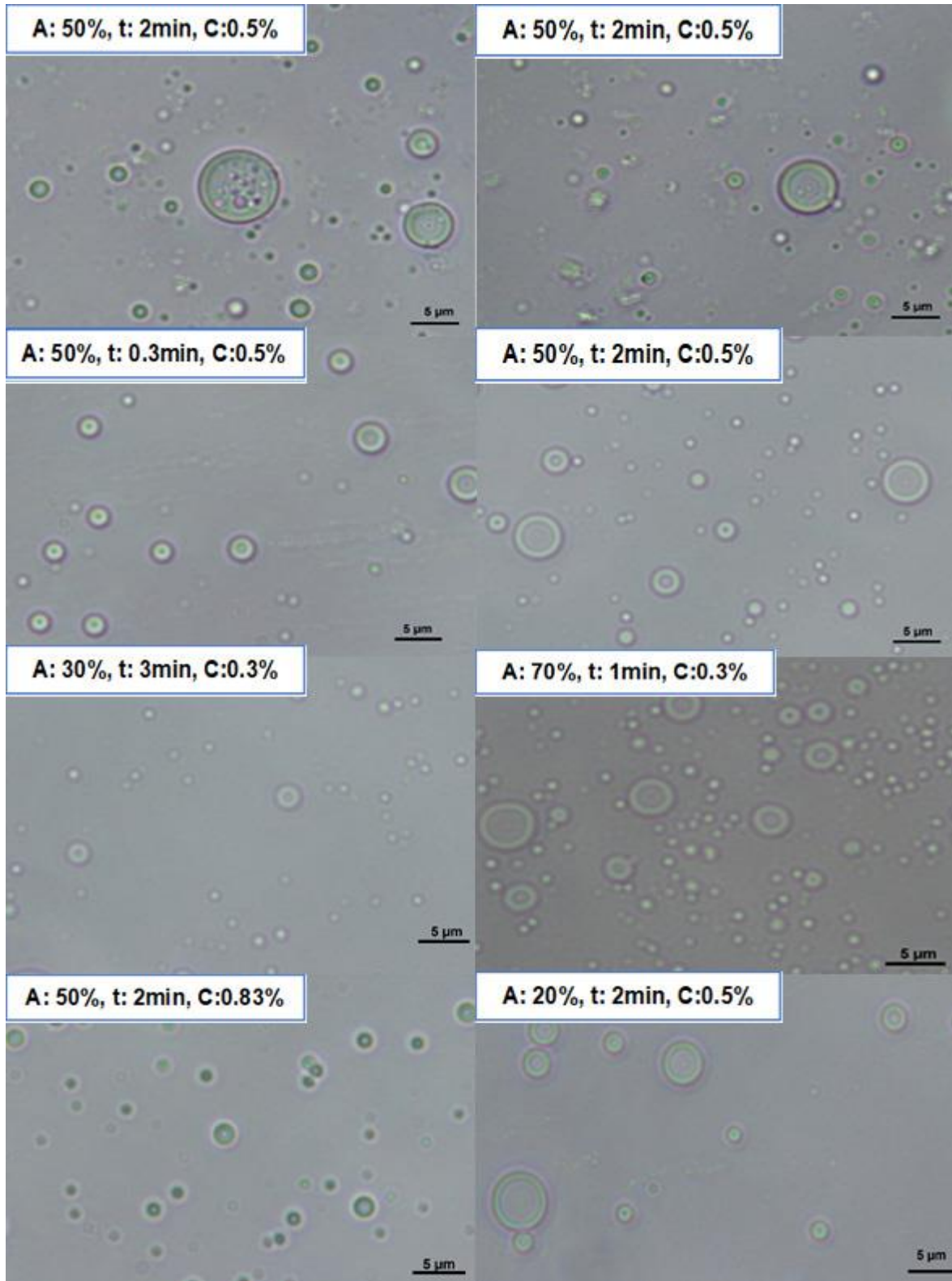


Figura 22. Morfología de gota 60 X, dilución 1:100 para emulsiones dobles con diferente concentración de emulsificante, tiempo y amplitud de sonicación. A= Amplitud, t= Tiempo, C= concentración de emulsificante.

«Continuación»



«Continuación»



6.5.2 Tamaño de gota, índice de cremado y evaluación de color en emulsiones dobles.

Como se ha mencionado, el tamaño de gota es uno de los factores que intervienen en las características de una emulsión y está relacionado con el tipo de emulsificantes y con el método de homogenización. En el caso de las emulsiones dobles se busca un tamaño de gota nanométrico que permita que la emulsión logre la mayor estabilidad. Los valores encontrados en este estudio para emulsiones dobles van desde $0.83 \pm 0.51 \mu\text{m}$ (834 nm) hasta $1.48 \pm 0.84 \mu\text{m}$. Menor a lo reportado por Zhang y Reineccius (2015), quienes realizaron emulsiones utilizando PGPR y goma arábica como emulsificantes, logrando una eficiencia de encapsulación mayor a 90% con tamaños de gota de 0.75 a $4.5 \mu\text{m}$. De la misma manera, Liu *et al.* (2019) estudiaron la encapsulación de antocianinas utilizando PGPR y Quillaja saponina, obteniendo tamaños de gota entre 30-40 μm , ambos estudios realizados con microfluidización.

En la Tabla 10 se muestra el análisis de varianza para el tamaño de gota ($R^2=78\%$), en donde la amplitud y el tiempo presentan un efecto significativo. En la Figura 24b se observa que, cuando la amplitud se mantiene constante, a mayor tiempo, menor tamaño de gota. Se obtuvo la misma tendencia al aumentar la amplitud y mantener el tiempo constante. Los valores de tamaño de gota más pequeños se obtienen en amplitudes mayores a 70%, en las concentraciones más bajas y en los tiempos mayores a 2 min (Figura 24a y 25c). Resultados similares se obtuvieron por Vélez-Erazo *et al.* (2018), en donde en amplitudes del 75 y 100%, se tienen tamaños de gota más pequeños ya que existe una mayor ruptura de gotitas y una propagación más uniforme de las ondas acústicas haciendo que se produzca en la proximidad de la sonda y en toda la extensión del fluido.

En el caso de la concentración, diversos autores coinciden en que a mayor concentración de emulsificante, menor es el tamaño de gota (Reichert *et al.*, 2018; Shima *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2013). Sin embargo, es importante recordar que existe una concentración óptima de emulsificante en la que se disminuye la tensión superficial del sistema y se logra la protección de las gotas formadas con la homogenización.

Fuera de esta concentración, la estabilidad y el tamaño de gota de la emulsión dependerá de la energía de homogenización (McClements, 2016). En este caso, se obtuvo que las concentraciones de quillaja saponaria no son significativas para el tamaño de partícula, sin embargo, existe una tendencia en la gráfica, en la que a menores concentraciones, en combinación con tiempo y amplitud, se tiene el menor tamaño de partícula (Tabla 10, Figura 23). Lo anterior nos dice que la concentración de quillaja saponaria está relacionada con otros factores como: las concentraciones de la W/O, la intensidad y el tiempo de sonicación, puesto a que por un lado se busca obtener el menor tamaño de gota, que se logra aumentando la concentración de surfactante. Mientras que por otro lado se busca la mayor eficiencia de encapsulación, que depende del equilibrio del sistema. Reichert *et al.* (2018) obtuvieron el menor tamaño de gota (0.171-0.208 μm) utilizando 0.5- 5% de quillaja saponaria, mientras que con concentraciones de 0.05- 0.1% no se logra cubrir la interface de las gotas formadas y por lo tanto, no se tiene estabilidad del sistema. Resultados similares se obtuvieron por Shima *et al.*, (2004) utilizando concentraciones entre 2 y 10% de monolaurato de glicerol, en donde a mayor concentración, menor tamaño de partícula. Sin embargo, la eficiencia de encapsulación se mantenía estable en almacenamiento utilizando la concentración más baja (2%), relacionando esto con la alteración del equilibrio del sistema, es decir, la diferencia en las concentraciones en la fase acuosa interna y en la fase acuosa externa. Es por esto que para seleccionar la concentración de emulsificante es necesario un análisis de optimización.

TABLA 10. Análisis de varianza (Suma de cuadrados) para el tamaño de gota, índice de cremado y los parámetros de color de las muestras de emulsiones dobles.

Fuente	DF	D (µm)	IC ₁ (%)	IC ₇	L* a*	b*	L* ₇	a* ₇	b* ₇	
Modelo	9									
Amplitud (A)	1	0.378*	7775.57*	10028.81*	77.974*	1.380	22.626*	43.484*	2.420	28.897*
Concentración (C)	1	0.245*	3351.40*	4521.11*	35.754*	0.216	0.583	14.166*	1.311*	2.318
Tiempo (t)	1	0.006	438.20*	975.30*	22.547*	0.353*	21.351*	18.165*	0.616	25.408*
A*C	1	0.067*	1382.83*	1423.63*	0.098	0.210	0.040	0.333	0.038	0.585*
A*t	1	0.033	355.56*	168.06	0.077	0.026	0.104	1.653	0.165	0.010
C*t	1	0.008	355.56*	168.06	2.561	0.422*	0.076	1.093	0.023	0.136
A²	1	0.005	200.00	168.06	0.046	0.034	0.067	0.129	0.208	0.321
C²	1	0.005	716.19*	1116.17*	16.424*	0.058	0.346	6.584*	0.005	0.014
t²	10	0.007	90.35	1293.54*	0.129	0.003	0.084	0.571	0.000	0.108
Residual	5	0.001	1120.41*	695.84*	0.076	0.061	0.000	0.164	0.049	0.000
FA	5	0.105	579.64	1270.44	12.062	0.573	1.351	6.747	1.578	1.088
Error	19	0.064	579.64	1270.44	9.182	0.457	1.061	6.052*	1.400*	0.776
Total		0.041	0.000	0.000	2.880	0.116	0.290	0.695	0.178	0.312
R²		0.484	8355.21	11299.25	90.035	1.954	23.977	50.231	3.998	29.985
		0.782	0.930	0.887	0.866	0.706	0.943	0.865	0.605	0.963

* Efecto significativo (p<0.05). FA= Falta de ajuste, R²= Coeficiente de correlación. D= Diámetro de gota, IC = Índice de cremado, 1= indica 1 día de almacenamiento, 7= indica 7 días de almacenamiento.

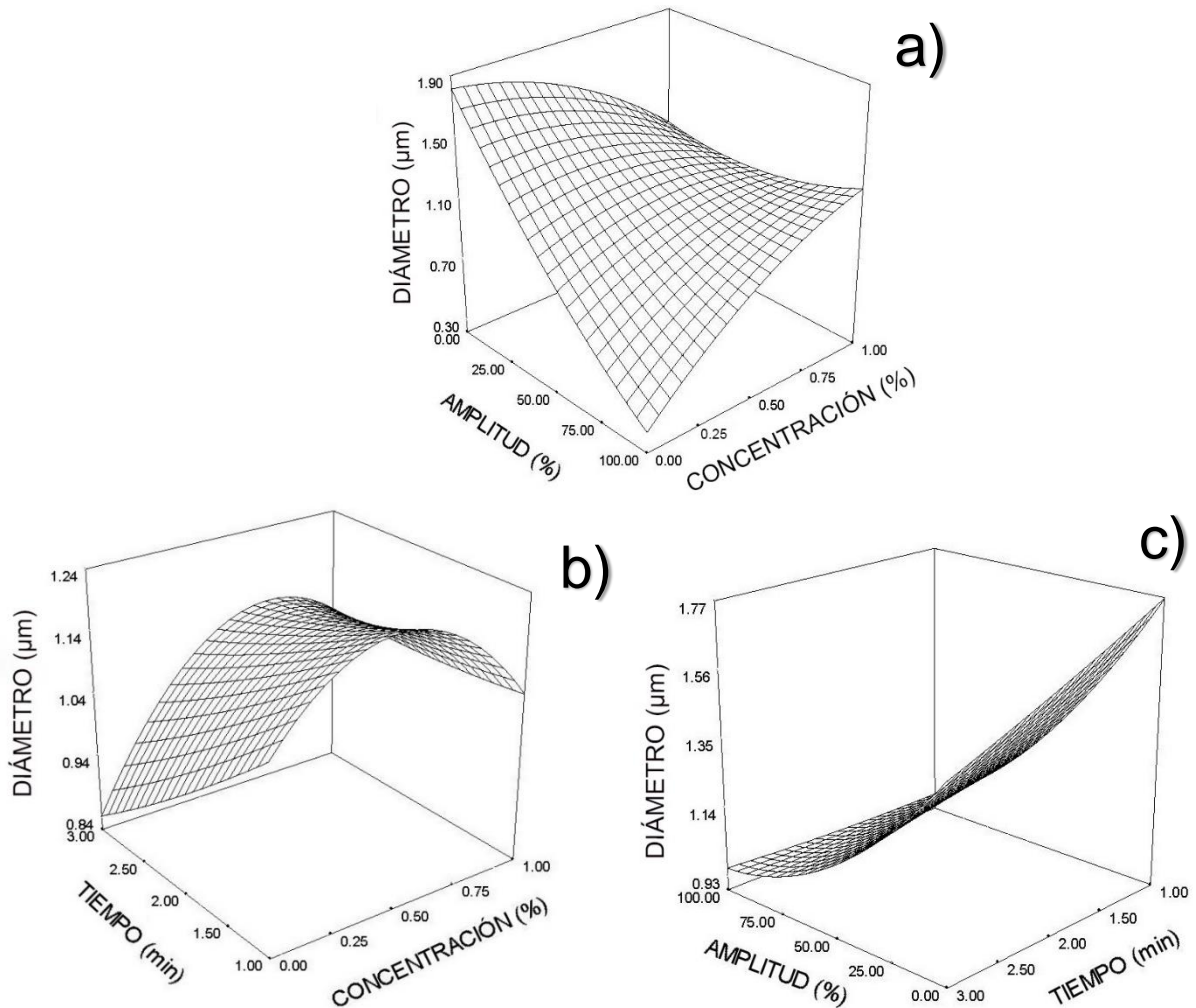


Figura 23. Superficie de respuesta de tamaño de gota en emulsiones dobles. a) Concentración de quillaja vs. Amplitud; b) Tiempo vs. Concentración de quillaja ; c) Amplitud vs. tiempo.

El producir emulsiones cinéticamente estables con tamaños de gota pequeños está relacionado con el método de homogenización utilizado. En este caso, con la intensidad de ultrasonido. La disminución del tamaño de gota se debe a la disipación de alta energía en el sistema que da resultado a la deformación y ruptura de gotas grandes en pequeñas (Iqbal *et al.*, 2014; Vélez- Erazo *et al.*, 2018). Es por esto que a mayor intensidad de ultrasonido, menor tamaño de gota. A diferencia de otras tecnologías como la homogenización de alta presión o el rotor-estator, el ultrasonido

se presenta como una tecnología de bajos requerimientos energéticos, y en este caso se utilizan tiempos muy cortos de procesamiento por lo que se presenta como una buena alternativa.

Como se ha mencionado, la forma de evaluar la estabilidad de las emulsiones es el índice de cremado. En el caso de las emulsiones dobles, la separación puede verse de forma marcada o de forma muy tenue, dependiendo de la concentración del emulsificante (Quillaja saponina), tal como se observa en la Figura 24 en donde, para las emulsiones con una concentración de 0.7% se muestra una línea de separación marcada, mientras que para las concentraciones menores, la separación es difícil de observar.



Figura 24. Índice de cremado en emulsiones dobles (Día 7). Amplitud, concentración (Quillaja saponaria), tiempo: a) 50%, 0.5%, 2 min, b) 30%, 0.7%, 3min, c) 50%, 0.5%, 2min, d) 70%, 0.7%, 1min, e) 30%, 0.3%, 1min.

El índice de cremado fue evaluado al día 1 y al día 7 de elaboración de emulsiones dobles. Los resultados al día 1 muestran un índice de cremado entre 0 y 53 %, mientras que al día 7, se obtuvieron valores entre 0 y 57%. En el análisis de varianza ($R^2= 93\%$) se puede observar que en el día 1, la amplitud y el tiempo muestran un efecto significativo ($p<0.05$), tanto en individual como en interacción. Mientras que la concentración solo tiene un efecto de manera individual. Por otro lado, para el día 7, se tiene efecto significativo para todas las variables únicamente de manera individual ($R^2= 88\%$).

En la Figura 25a se muestra que, a concentraciones altas y amplitudes bajas, se tiene un mayor índice de cremado, mientras que al aumentar la intensidad del ultrasonido y disminuir la concentración, el índice de cremado disminuye (Figura 25b). Por otro lado, la mayor estabilidad se obtiene en los tiempos más largos de procesamiento (Figura 25c). Lo anterior se muestra con mayor claridad al día 7, en donde el menor índice de cremado se presenta en las emulsiones elaboradas en amplitudes mayores al 70% (Figura 26a), concentraciones menores al 0.5% (Figura 26b) y tiempos de procesamiento mayores a 1 min (Figura 26c). Como se ha mencionado anteriormente, la disminución del tamaño de partícula y la estabilidad de las emulsiones depende de la intensidad del ultrasonido y contrario a las emulsiones simples, es necesaria una mayor intensidad para formar emulsiones estables. Esto atribuido a que es necesaria la formación rápida de gotas pequeñas, evitando así la coalescencia de las gotas anteriormente formadas. Resultados similares se obtuvieron por Ozturk *et al.* (2014), en donde al realizar una comparación entre lecitina y quillaja saponaria se obtuvo que para lograr un diámetro de gota pequeño era necesario una concentración de lecitina de 2%, mientras que de quillaja saponaria solo fue necesario 0.5%. Sin embargo, el tamaño de gota estaba mayormente relacionado con el uso de intensidades y tiempos de sonicación elevados.

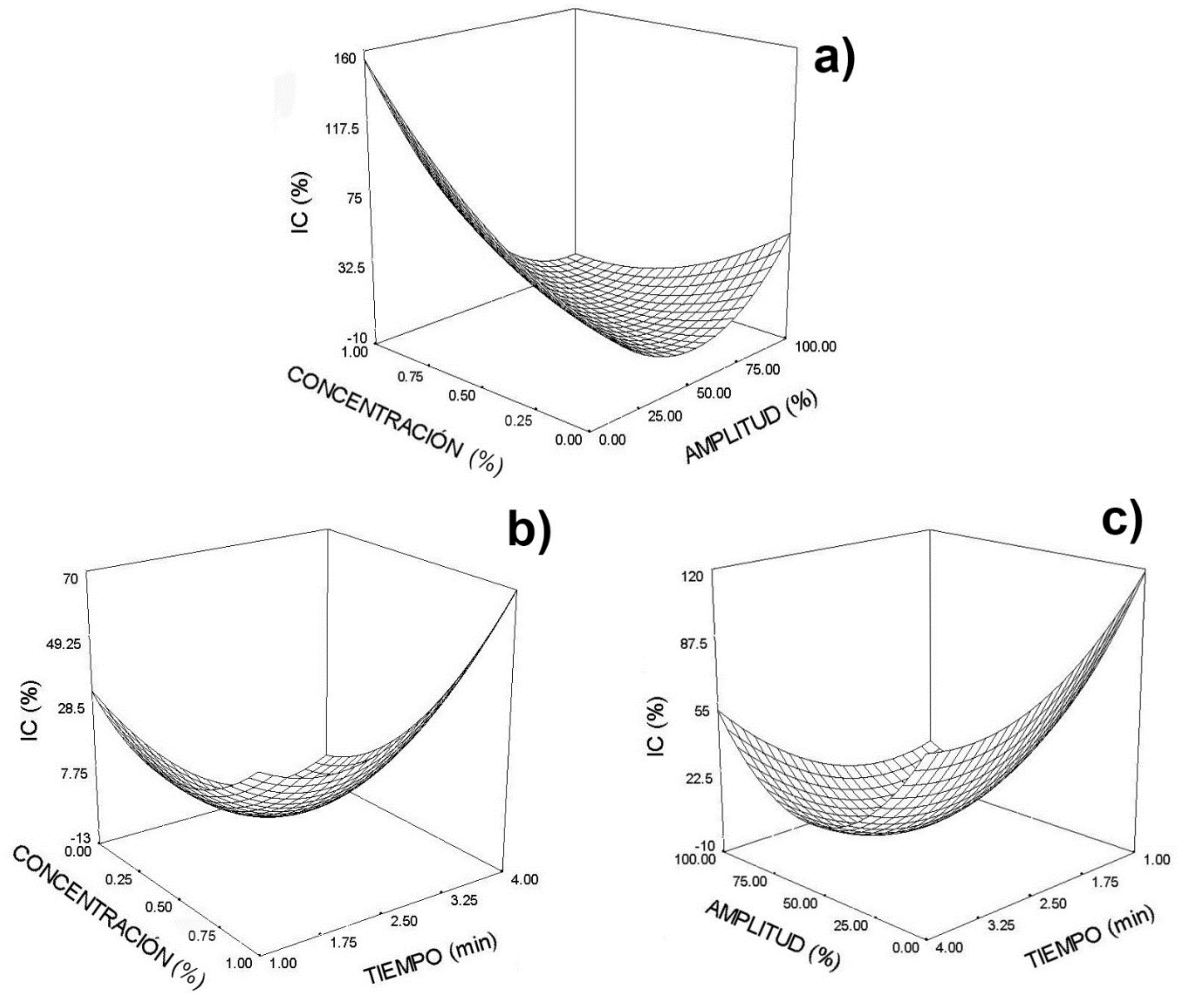


Figura 25. Superficie de respuesta del índice de cremado (IC) (Día 1) en emulsiones dobles. a) Concentración (Quillaja saponaria) vs. Amplitud; b) Concentración (Quillaja saponaria) vs. tiempo; c) Amplitud vs. tiempo.

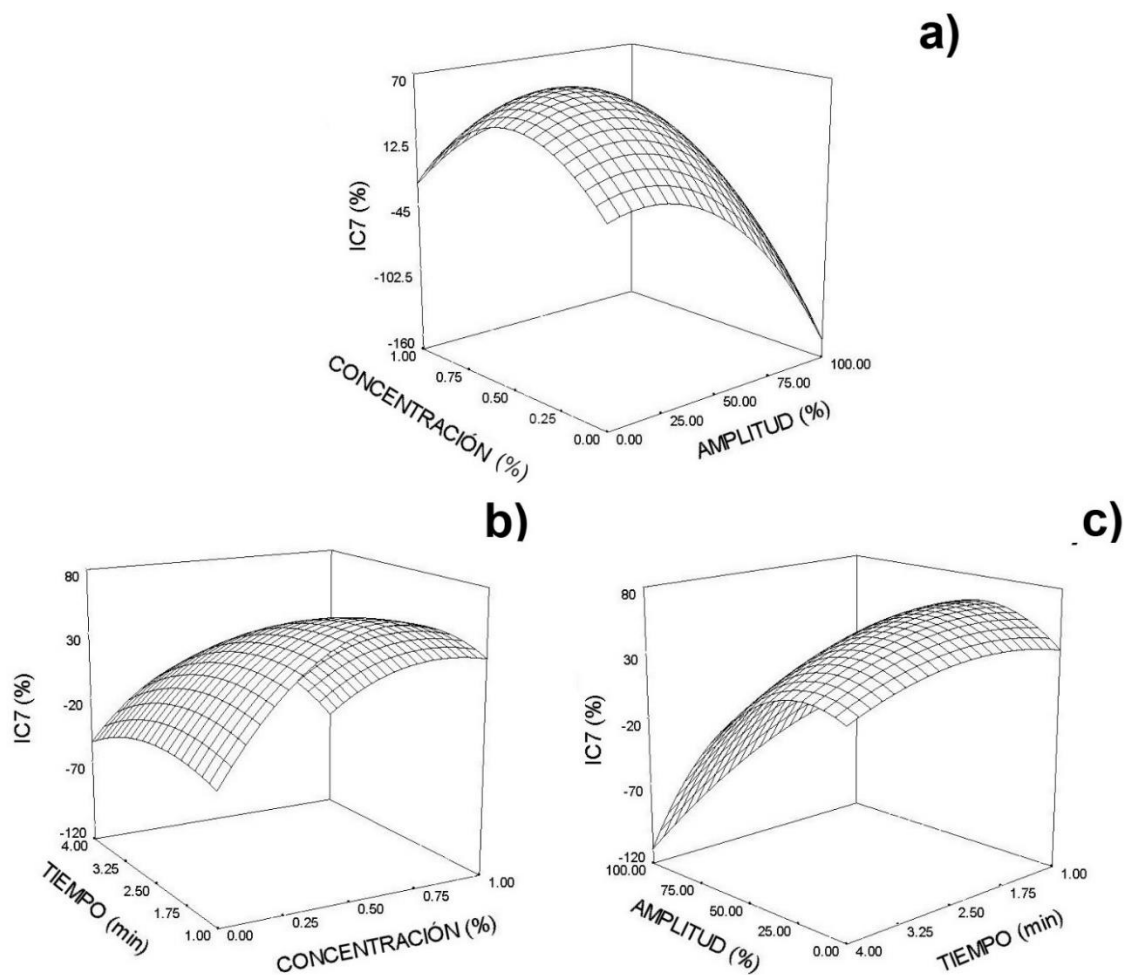


Figura 26. Superficie de respuesta del índice de cremado (Día 7) en emulsiones dobles. a) Concentración (Quillaja saponaria) vs. Amplitud; b) Tiempo vs. Concentración (Quillaja saponaria); c) Amplitud vs. tiempo.

En las emulsiones dobles, el color es uno de los parámetros que nos permite conocer mediante la homogeneidad, la estabilidad de las emulsiones. En el caso del parámetro L^* (Día 0 y Día 7), se tiene una tendencia al color blanco (+) para todas las muestras, presentando un efecto significativo para la amplitud y la concentración con un coeficiente de relación de 86% (Tabla 10). A medida que aumenta la intensidad del ultrasonido y se disminuye la concentración de Quillaja, existe un aumento en la luminosidad de las muestras, esto relacionado con la disminución de la gota y por lo

tanto, con la estabilidad (Figura 27). Resultados similares se obtuvieron por Chung *et al.* (2017) quienes estudiaron la fabricación de una crema para café utilizando lecitina y quillaja saponaria. En dicho estudio se menciona que las emulsiones tratadas con quillaja saponaria presentaron una disminución en el parámetro L^* debido a su coloración café oscuro. Sin embargo, al aumentar la intensidad de ultrasonido se aumenta también la luminosidad de la emulsión.

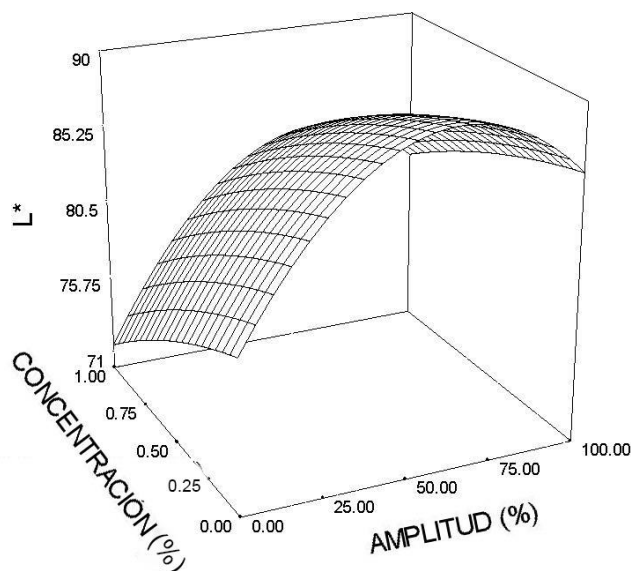


Figura 27. Superficie de respuesta (Amplitud vs. Concentración Quillaja saponaria) del parámetro L^* (Día 0) en emulsiones dobles.

Por otro lado, al hablar del parámetro a^* , existe una tendencia a la coloración roja (+). El análisis de varianza (Tabla 10) muestra que al día 0, se tiene un efecto significativo tanto en la concentración como en la interacción del tiempo con la amplitud ($R^2= 70\%$). Mientras que al día 7, la diferencia significativa está dada únicamente por la amplitud de ultrasonido ($R^2= 60\%$). A medida que aumenta la concentración y la amplitud, el parámetro a^* disminuye (Figura 28a). Este mismo efecto se observa con un mayor tiempo de exposición al ultrasonido. Lo anterior se puede atribuir a factores como la disminución de gotas de extracto dispersas en el aceite, ya que como se había

mencionado, a medida que se aumenta la amplitud de ultrasonido se tiene una disminución del tamaño de partícula y con esto una mejor encapsulación, por lo tanto, la disponibilidad de los compuestos a ser detectados es menor. Sin embargo, existe una posible degradación de betalaínas por el aumento de temperatura durante la sonicación, que aunque las emulsiones fueron procesadas en baño con hielo, la intensidad del ultrasonido mediante la cavitación, provoca un aumento de temperatura y con esto, la disminución de la tensión superficial y la viscosidad del medio, aumentando la posibilidad de degradación de los pigmentos (Maran *et al.*, 2015).

Otro de los factores que puede influir en los parámetros de color de la emulsión es el color, tanto del aceite como de los emulsificantes. Esto último tiene una mayor influencia en el parámetro b^* puesto a que el aceite de canola y los emulsificantes utilizados presentan coloración amarilla, lo que ocasiona que al aumentar la concentración se tenga una mayor tendencia al amarillo (+), tal como se observa en la Figura 29. Resultados similares se obtuvieron por Gul *et al.* (2018), quienes evaluaron el efecto del ultrasonido en películas de nano emulsión a partir de harina de avellana y aceite esencial de clavo, obteniendo un incremento en el parámetro L^* y una disminución significativa de los parámetros a^* y b^* . Estos resultados fueron asociados con el contenido de polifenoles presentes en el aceite de clavo y con el cambio en el tamaño medio de las gotas en la emulsión.

El análisis de varianza de la Tabla 10 muestra un efecto significativo para el parámetro b^* dado por la concentración y por el tiempo de ultrasonido, 7 días después de la elaboración ($R^2= 96\%$). La influencia del tiempo de ultrasonido puede relacionarse con la degradación de las betalaínas al mayor tiempo de procesamiento, lo que indica un cambio hacia la región amarilla (Figura 29d), probablemente debido a la formación de ácido betalámico, derivados descarboxilados o productos de oxidación (Pagano *et al.*, 2018). Sin embargo, el cambio de coloración al día 7 puede también estar relacionado con la oxidación del aceite de canola durante almacenamiento (Sivagnanam *et al.*, 2019).

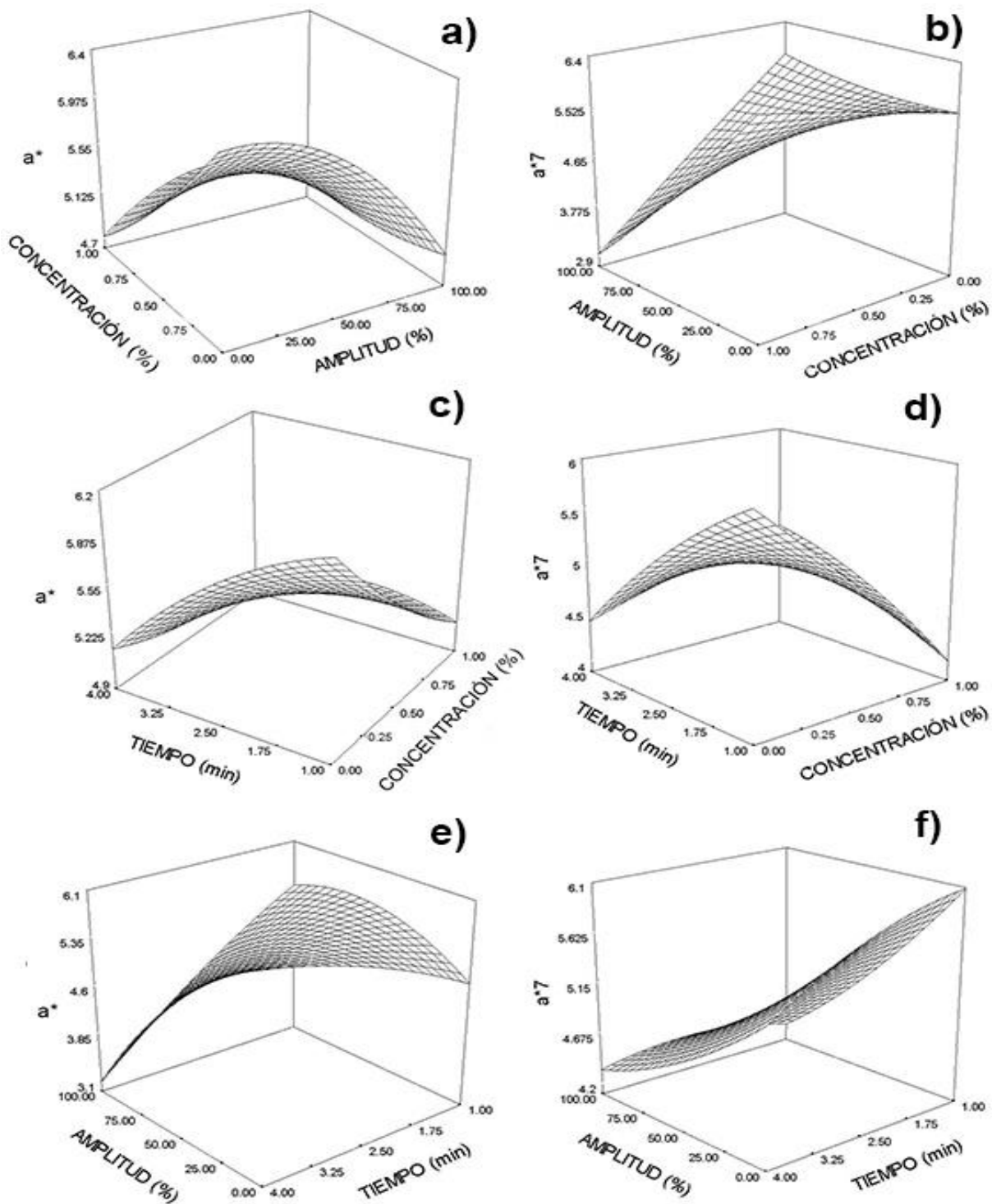


Figura 28. Superficie de respuesta del parámetro de color a^* (Día 0 y 7) en emulsiones dobles. a), b) Concentración (Quillaja saponaria) vs. Amplitud; c), d) Concentración (Quillaja saponaria) vs. tiempo; e), f) Amplitud vs. tiempo.

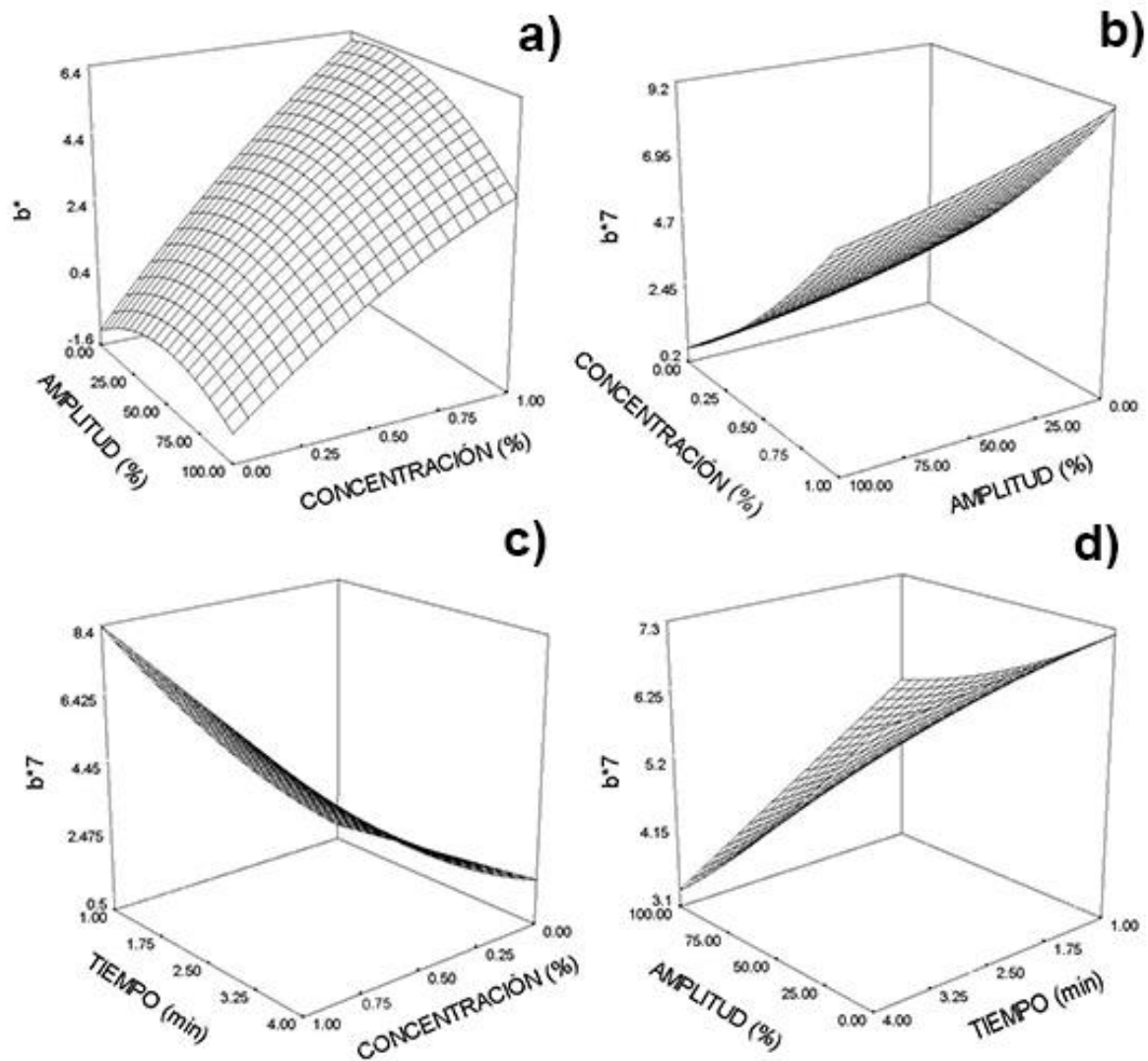


Figura 29. Superficie de respuesta del parámetro de color b^* (Día 0 y 7) en emulsiones dobles. a), b) Concentración (Quillaja saponaria) vs. Amplitud; b) Concentración (Quillaja saponaria) vs. tiempo; c) Amplitud vs. tiempo.

6.5.3 Optimización de emulsiones dobles.

La estabilidad de las emulsiones dobles está representada por un bajo índice de cremado (0%), el menor tamaño de gota (<1 μm) y en este caso, una mayor estabilidad a cambios de coloración, específicamente mantener constante el parámetro a^* . Para determinar las condiciones óptimas de procesamiento de las emulsiones dobles, es decir, amplitud, tiempo y concentración, se realizó un análisis de optimización (Figura 30) en donde se observa que las condiciones óptimas son: Amplitud del 73%, 0.1636% de concentración de Quillaja saponaria y un tiempo de procesamiento de 2.246 min. Estas condiciones fueron seleccionadas para la evaluación de emulsiones dobles a diferentes condiciones.

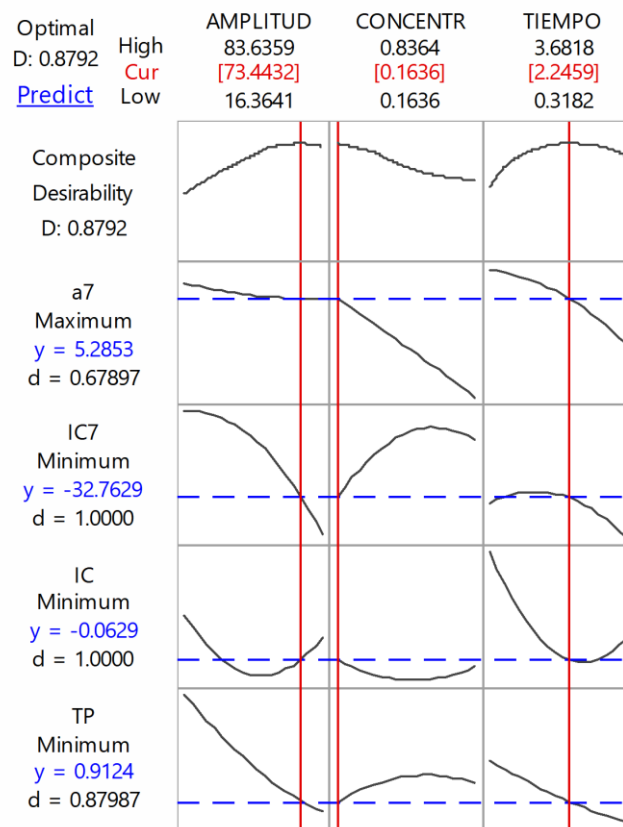


Figura 30. Gráfica de optimización para emulsiones dobles (Minitab Statistical Software, 2013). IC= índice de cremado (%), TP= tamaño de gota (μm).

6.5.3.1 Verificación experimental de la optimización.

Para la verificación se utilizaron emulsiones elaboradas con dos extractos, el extracto 1 consistió en el extracto sin liofilizar y el extracto 2 consistió en el extracto liofilizado/concentrado. Esto para determinar la influencia de los sólidos en la estabilidad. Las emulsiones dobles obtenidas con las condiciones de optimización fueron analizadas tanto en tamaño de partícula, índice de cremado y parámetros de color. Lo anterior para verificar experimentalmente la optimización arrojada por el análisis estadístico y así determinar el porcentaje de error. El valor de la optimización para el tamaño de gota fue de $0.91\mu\text{m}$, mientras que en las emulsiones se obtuvieron diámetros de gota entre 0.90 y $1.01\mu\text{m}$. Esta variación puede deberse a la movilidad de las gotas en la emulsión, lo que interviene en la toma de fotografías y por lo tanto, en las mediciones. El porcentaje de error promedio para el diámetro de gota fue de 10%. En el caso del índice de cremado, los valores esperados rondaban desde -0.06 a -32% , es decir, se esperaba el valor más bajo de índice de cremado que es de 0% , lo que indica que no hay separación de fases, obteniendo este resultado para todas las muestras, tal como se observa en la Tabla 11. Por otro lado, para el parámetro a^* de color se esperaban valores máximos, es decir, la mayor estabilidad en almacenamiento. Los valores de la optimización rondaban en 5.29 , sin embargo, en la parte experimental, los extractos tenían una mayor concentración de betalaínas, por lo que el parámetro a^* era de 7.68 a 16.50 . En el caso de las emulsiones con extracto 2, no existe diferencia significativa entre el parámetro a^* al día 0 y al día 7 de almacenamiento, manteniendo el valor máximo.

TABLA 11. Tamaño de gota, índice de cremado y parámetro a^* de color en emulsiones dobles.

Emulsión	Día	IC (%)	PD (μm)	D (μm)	E (%)	Pa*	a*	E (%)
Extracto 1	0	0	0.91	1.07 ± 0.07	17.58	5.29	7.88 ± 0.28	37.88
	0	0	0.91	0.90 ± 0.16	1.1	5.29	8.17 ± 0.63	55
Extracto 2	7	0	0.91	1.01 ± 0.11	11	5.29	8.14 ± 0.08	54.16

Media \pm desviación estándar, $n=2$. IC= índice de cremado, PD= predicción de diámetro, D= diámetro de gota, Pa*= predicción de a^* , E= error.

6.6 Evaluación de emulsiones dobles a diferentes condiciones.

6.6.1 Temperatura

Dentro del procesamiento de alimentos hay diversos factores que influyen en la degradación o en la modificación de compuestos, tales como la temperatura, pH y concentración. Es por esto que fue necesario evaluar el comportamiento de las emulsiones a distintas condiciones. Como se mencionó en la sección anterior, se realizaron emulsiones dobles utilizando amplitud del 73%, concentraciones de Quillaja de 0.16% y tiempos de ultrasonido de 2.24 min. Las emulsiones obtenidas fueron evaluadas a 30, 45, 60, 75 y 90°C para determinar su estabilidad. En el caso de la morfología de gota, se puede observar que las muestras tratadas con temperaturas menores a 60°C aún presentan glóbulos de aceite y dentro de ellos pequeñas gotas de extracto. En las muestras tratadas a 45°C (Figura 31) se observan también glóbulos de aceite y fuera de ellos, pequeñas gotas, lo que podría deberse al inicio de la liberación del extracto encapsulado. Específicamente en las muestras tratadas a 60°C (Figura 31) se observan las gotas de extracto ya liberadas y la morfología se ve como la de las emulsiones simples. Sin embargo, esta no es de manera completa ya que aún pueden verse gotas propias de la emulsión doble. En el caso de las muestras tratadas con 75 y 90°C se observa la agregación de gotas, así como la presencia de glóbulos de grasa vacíos, lo que se atribuye a la separación de fases.

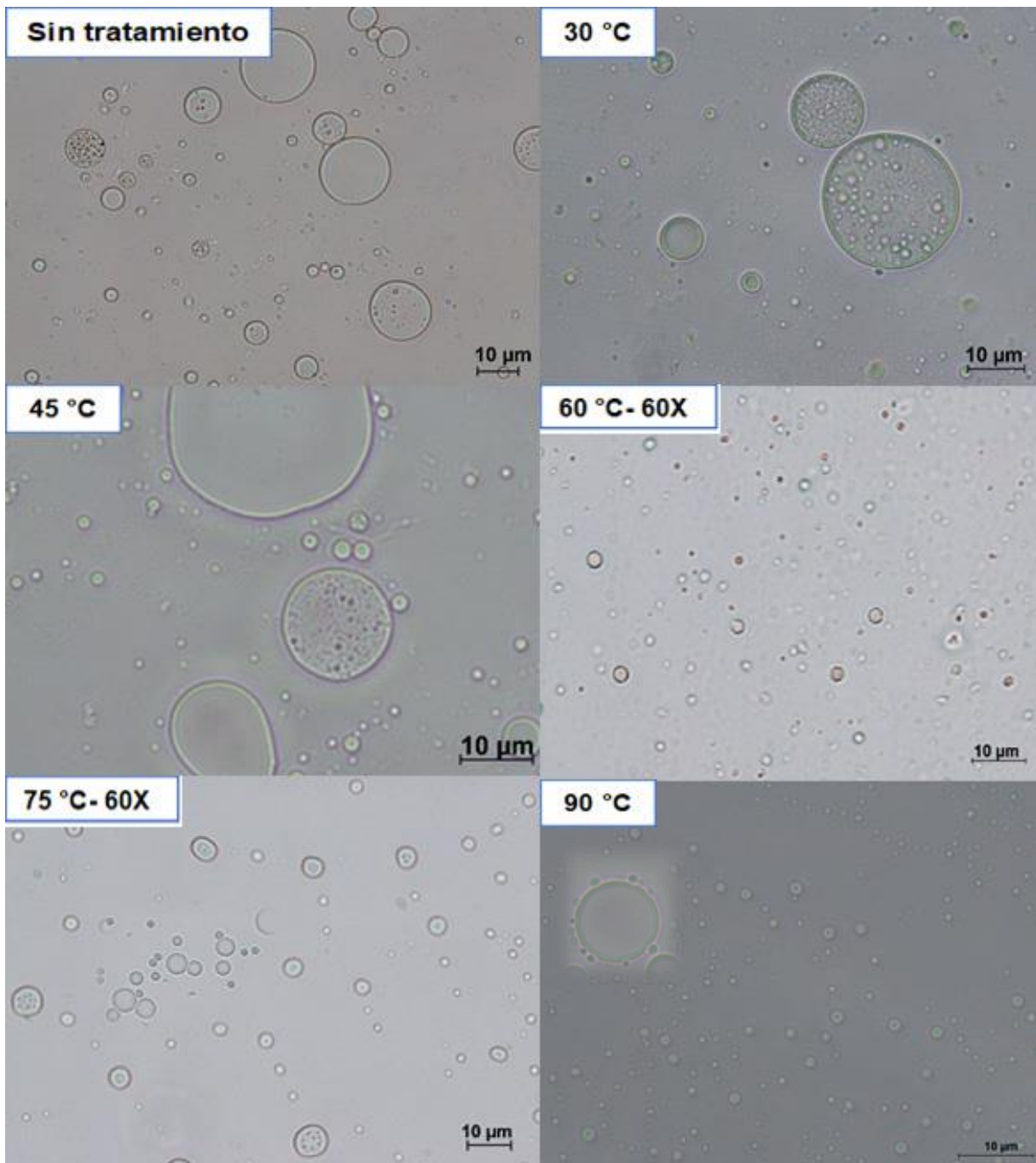


Figura 31. Morfología de gota 60-100X, dilución 1:100 para emulsiones dobles con diferentes tratamientos de temperatura.

En el caso del tamaño de gota, el efecto de la temperatura se observa en la Figura 32a. Los valores obtenidos para tamaño de gota van desde $1.13 \mu\text{m} \pm 0.04$ hasta $1.91 \mu\text{m} \pm 0.06$, y las muestras sin tratamiento con un diámetro de $1.10 \mu\text{m} \pm 0.01$. El análisis de varianza indica que existe diferencia significativa entre muestras, observándose que las muestras tratadas con temperaturas de 75 y 90 °C tienen un aumento en el tamaño de gota, esto atribuido a la liberación de las gotas encapsuladas y a la agregación de las mismas. El tamaño de gota y la separación de fases está relacionada con el índice de cremado. En la Figura 32b se observa que existe diferencia significativa entre muestras, en donde la menor separación ocurre en las muestras tratadas a 30°C, mientras que las muestras tratadas a más de 45°C presentan una separación completa de fases. Yang *et al.* (2013) mencionan que la resistencia de las emulsiones a los cambios por temperatura dependerá de la estructura química del surfactante y de la naturaleza de la fase oleosa, que como se había mencionado el aceite de coco y el span 80 son susceptibles a la temperatura.

Los resultados obtenidos difieren con lo reportado por Ozturk *et al.* (2014) en donde al someter emulsiones simples O/W de vitamina E y Quillaja a cambios de temperatura, no existe una diferencia significativa en el tamaño de gota de las muestras, siendo esto una ventaja de las emulsiones dobles. Esto indica que en las emulsiones simples, la liberación de las gotas no ocurre de manera controlada, es decir, las emulsiones dobles permiten que a temperaturas mayores a 45°C exista una separación de fases y con esto una liberación del extracto encapsulado, sin alterar los componentes, mientras que en las emulsiones simples no existe una separación de fases y por lo tanto, el color se pierde dentro de la emulsión. Liu *et al.* (2020) atribuyen la resistencia a cambios por temperatura a la cristalización de la fase oleosa utilizada, ya que al derretirse los cristales de grasa se puede contribuir al aumento de dimensiones de las gotas de agua, por lo que el tipo de aceite utilizado tendría influencia en la morfología y tamaño de gota de las emulsiones.

Se ha mencionado que la temperatura es uno de los factores que más tienen efecto en los cambios de coloración durante el procesado de alimentos por lo que se evaluó

el cambio de color a diferentes temperaturas. Cabe mencionar que en las emulsiones el color puede verse alterado por todos los componentes de la misma. Es decir, el cambio en el parámetro L^* y el parámetro b^* pueden estar relacionados con la presencia de los emulsificantes, así como también de la estabilidad de los aceites. Inicialmente, las muestras tenían una luminosidad de 86.25 ± 1.68 , la cual disminuyó a medida que se sometían a mayor temperatura, terminando en 25.18 ± 0.95 . El análisis de varianza muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras de 30 y 45°C con las tratadas a 75 y 90°C, mientras que las tratadas a 60 °C son diferentes a todas las muestras (Figura 32c). Las muestras de 60°C no presentan una separación de fases completa, por lo que puede atribuirse a esto la diferencia en la coloración. Por otro lado, al observar el parámetro a^* (Figura 32d), con tendencia al color rojo, la emulsión sin tratamiento tenía un parámetro a^* de 8.07 ± 0.74 , mientras que las emulsiones tratadas a más de 60 °C presentaron valores de entre 1.64 ± 0.01 y 0.54 ± 0.08 . Cómo se puede observar, se tiene una disminución significativa de coloración en muestras tratadas a más de 60°C, siendo un efecto indeseable en la retención de compuestos y que puede estar relacionado a que las emulsiones pierden estabilidad a partir de 60 °C y con ello, ocurre la liberación de las betalaínas. Sumando esto al tiempo al que fueron sometidas a estas temperaturas, logrando su degradación. Sin embargo, a temperaturas menores de 60 °C, o al momento de la liberación, puede tenerse una retención del 90% de los compuestos de interés.

Durante el proceso térmico, la betanina puede degradarse por isomerización, descarboxilación o escisión, lo que daría una reducción gradual del color rojo mediante la aparición de un color marrón claro. Con esta degradación pueden formarse compuestos como la neobetanina o el ácido betalámico, que tienen tendencia a coloración amarilla (Azeredo, 2008). Sin embargo, en este caso se observa como inicialmente se tenían muestras con un parámetro de color b^* de -0.62 ± 0.20 , siendo esta una tendencia a la coloración azul (-), propia del extracto de garambullo (Figura 32e). A medida que se aumentó la temperatura, a 30 y 45°C, la tendencia de coloración cambia a amarillo (+) con valores entre 0.15 ± 0.12 y 0.64 ± 0.11 . Posteriormente, a temperaturas mayores, la tendencia vuelve a ser azul con valores entre -2.46 ± 0.46 y

-1.69 ± 0.27. Con lo anterior no es posible asegurar que los cambios en la coloración sean atribuidos a la degradación de betalaínas ya que no se presenta un aumento claro en la tendencia de coloración amarilla. El cambio inicial que se observa puede atribuirse al cambio de fase del aceite de coco, lo que logra una mayor exposición de los demás componentes.

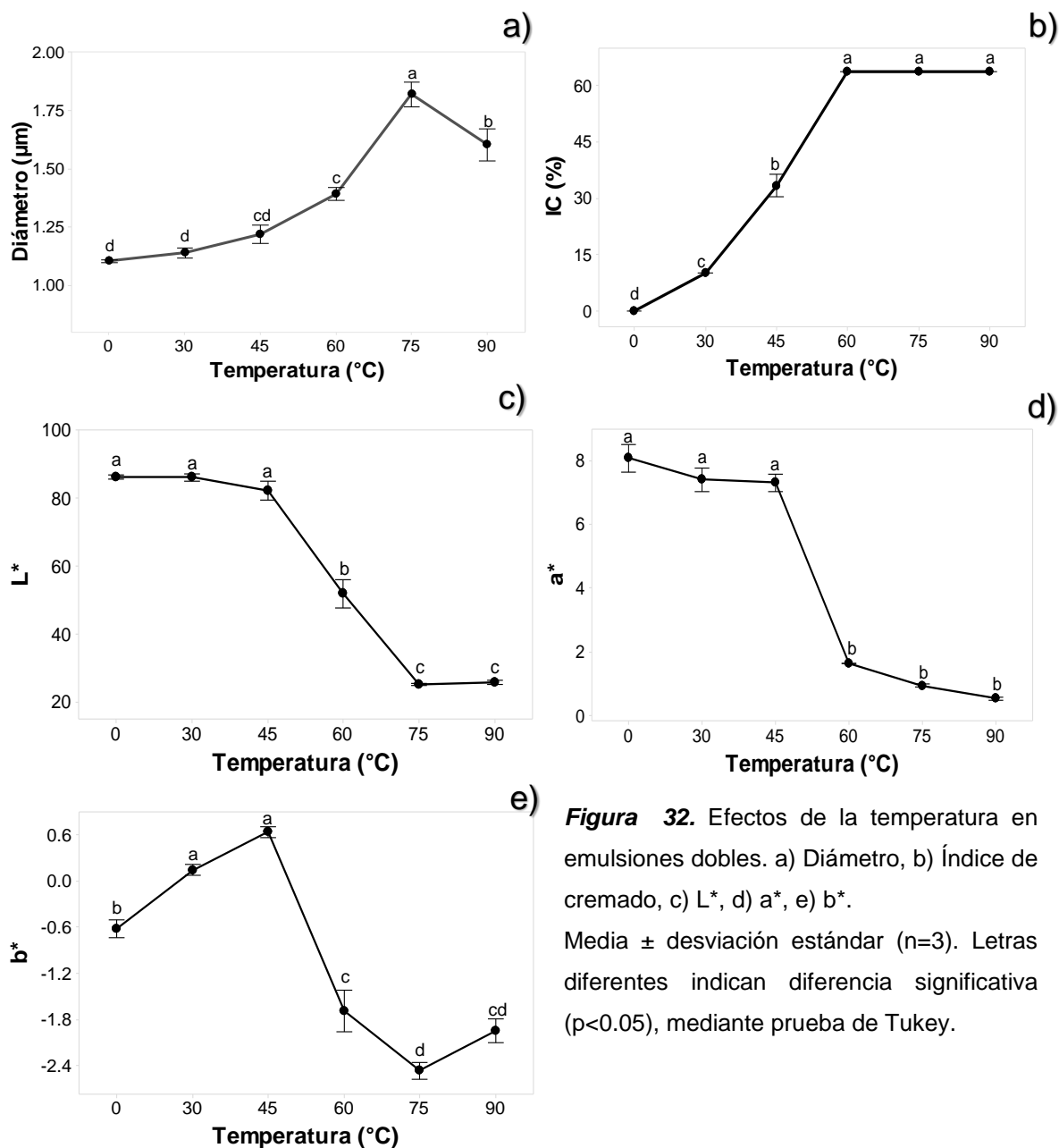


Figura 32. Efectos de la temperatura en emulsiones dobles. a) Diámetro, b) Índice de cremado, c) L*, d) a*, e) b*.

Media ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05), mediante prueba de Tukey.

6.6.1 pH.

Otro de los factores que tiene mayor influencia en la degradación de betalaínas es el pH. En este caso se evaluaron las emulsiones a pH de 2,4,6,8 y 10, obteniendo para tamaño de gota (Figura 34a) diferencia significativa entre las muestras a pH de 2 y pH de 8, siendo los diámetros obtenidos de 1.18 ± 0.02 y 0.90 ± 0.04 respectivamente. Con estos resultados podría decirse que las emulsiones dobles son estables a pH mayores a 2 y menores que 8. No obstante, con los resultados obtenidos para el índice de cremado (Figura 34b) se pensaría que la mayor estabilidad se obtiene a un pH de 2 y un pH de 10 al no existir índice de cremado en estas muestras. Sin embargo, estos valores se deben a la pérdida de coloración de las muestras puesto a que al perder la estabilidad también se libera el componente bioactivo y con esto la separación de fases no se observa de manera clara. Ozturk *et al.* (2014) obtuvieron resultados similares en los que las emulsiones estabilizadas con Quillaja mostraron diámetros de gota relativamente pequeños a pH de 3 a 8, mientras que el tamaño de gota aumento apreciablemente a un pH de 2. En la Figura 33 se observa que existe liberación del extracto a pH de 2, mostrándose como gotas de color rosa fuera de las cápsulas de grasa. Lo anterior atribuido a que a pH de 2 la repulsión electrostática puede no haber sido lo suficientemente fuerte para superar las interacciones atractivas que actúan entre las gotas, lo que conduce a la agregación. Estos autores mencionan que las saponinas tienen un pKa alrededor de pH 3-3.5, por lo que la protonación de los grupos ácido carboxílico por debajo de ese pH pueden llevar a la desestabilización del sistema. En este caso, también se utiliza como emulsificante el Span 80, el cual tiene un pKa aproximado de pH 5, por lo que la mayor estabilidad se tendría alrededor de ese pH (Levy y Anello, 1969).

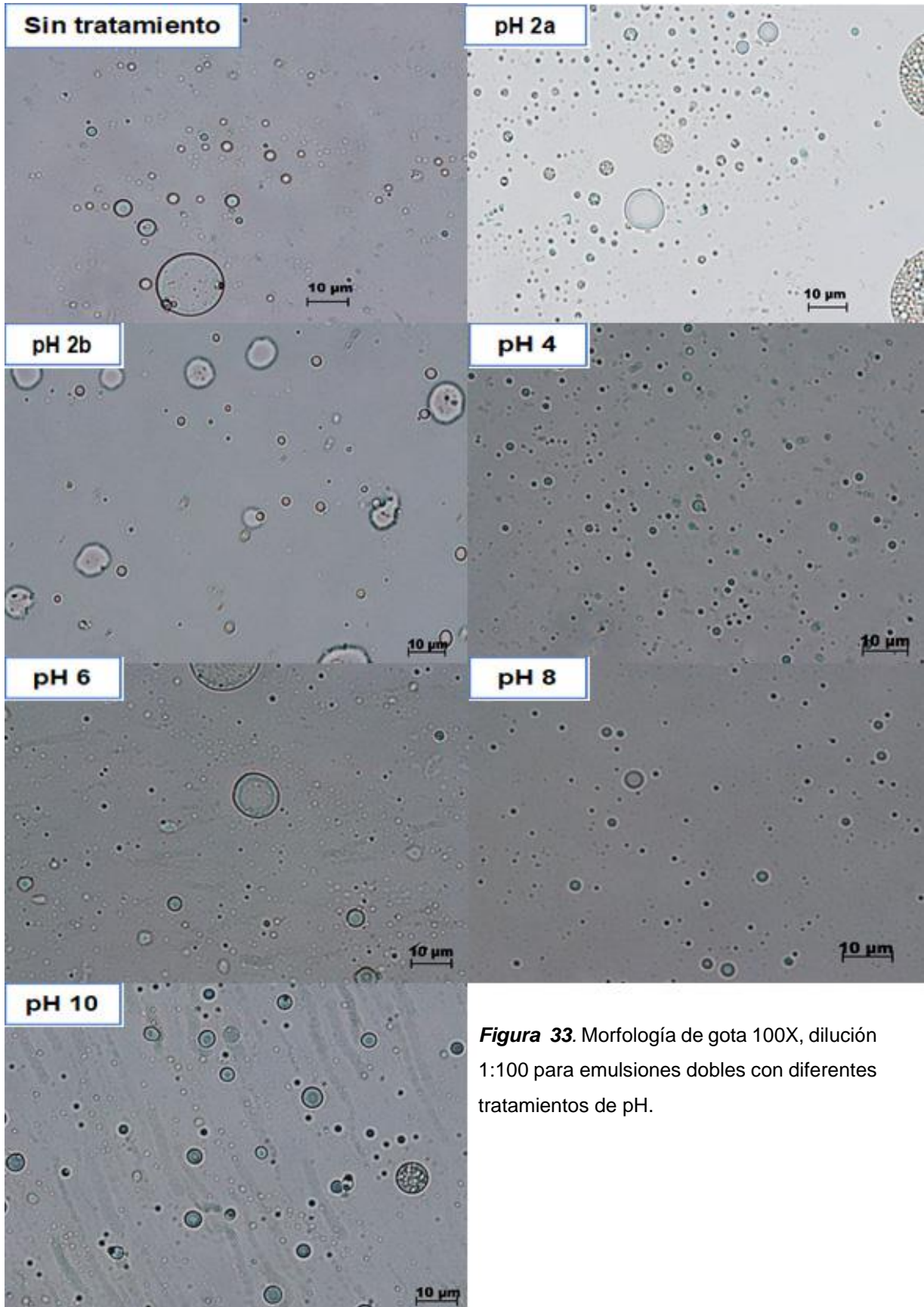


Figura 33. Morfología de gota 100X, dilución 1:100 para emulsiones dobles con diferentes tratamientos de pH.

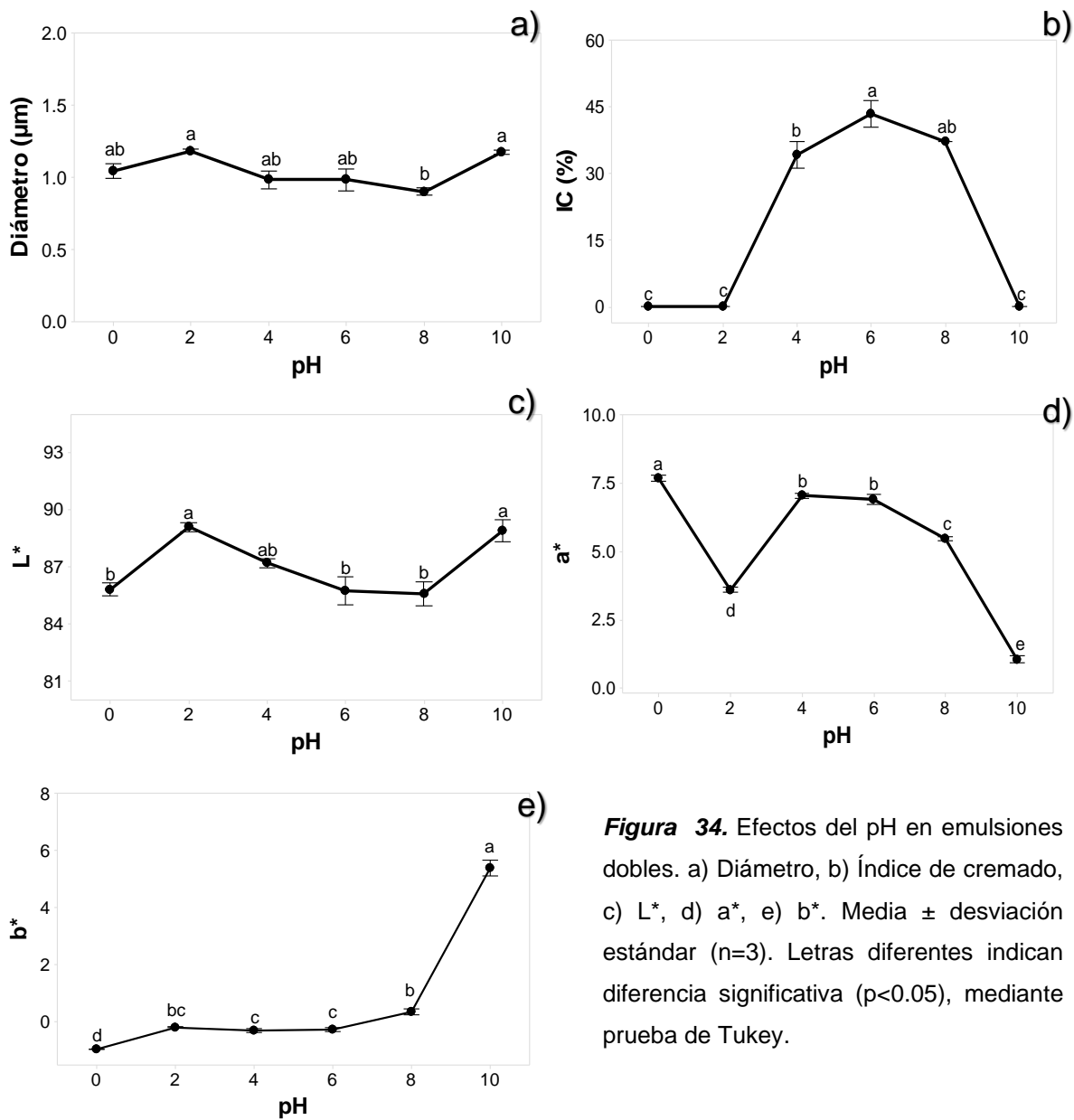


Figura 34. Efectos del pH en emulsiones dobles. a) Diámetro, b) Índice de cremado, c) L*, d) a*, e) b*. Media \pm desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante prueba de Tukey.

Como se ha mencionado, las betalaínas son estables a rangos de pH entre 3 y 7, y al estar expuestas fuera de este rango pueden llegar a degradarse. Las emulsiones evaluadas en este estudio mostraron un aumento en la luminosidad a pH de 2 y pH de 10, tal como se muestra en la Figura 34c. Esto se atribuye a la pérdida de estabilidad y a la degradación de las betalaínas que puede observarse mejor en los parámetros de color a^* y b^* . En el parámetro a^* en la Figura 34d se muestra una diferencia significativa entre las emulsiones sometidas a cambios de pH y la emulsión sin tratamiento (identificada como pH 0). En todos los casos se tiene una disminución en la coloración roja de la emulsión. Las muestras que presentan mayor disminución de la coloración son las tratadas a pH de 10 y por el contrario existe un aumento de la tendencia a la coloración amarilla del parámetro b^* (Figura 34e), es decir, existe un aumento significativo del color amarillo, teniendo valores positivos para este parámetro. Las condiciones alcalinas en las betalaínas causan la hidrólisis del enlace aldimina, lo que da como resultado ácido betalámico (amarillo brillante) y ciclo-Dopa 5-O- β -glucósido (incoloro), lo que explica la disminución del parámetro a^* y el aumento del parámetro b^* en las muestras tratadas a pH de 10. Mientras que la acidificación del medio induce la recondensación del ácido betalámico con el grupo amina de los residuos de adición por lo que no se observa el aumento en el parámetro b^* en las muestras tratadas con pH 2 (Herbach *et al.*, 2006).

6.6.2 Influencia de la fuerza iónica.

Los alimentos y las bebidas varían considerablemente en sus concentraciones de sal por lo que se evaluó la influencia de la fuerza iónica en la estabilidad de las emulsiones. Las emulsiones tratadas con concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mM no presentaron diferencia significativa para tamaño de gota, así como para los parámetros de color L^* y b^* . La morfología de gota se observa en la Figura 36, sin presentarse diferencia entre las emulsiones por adición de sal. Mientras que en el índice de cremado (Figura 35a) se observan diferencias entre emulsiones, sin embargo, esta separación se atribuye a la agregación de la solución de NaCl, lo que ocasionó que se

viera una fase sin homogenizar, que en realidad no formaba parte de la emulsión. Yang *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares en la formación de emulsiones utilizando quillaja saponina ya que no se observó diferencia significativa en muestras con bajo contenido de sal (<300 mM), mientras que a mayor concentración existió separación de fases. Esto se atribuye a que al aumentar la concentración de sal existe una disminución en la repulsión electrostática, lo que ocasiona agregación de las gotas. Por otro lado, para el presente estudio, en el parámetro a^* se tiene una diferencia significativa entre muestras (Figura 35b), las emulsiones tratadas a más de 300 mM presentan una disminución en la coloración, que al no existir alguna diferencia en el parámetro b^* , podría decirse que el color se diluyó al agregar la solución de NaCl.

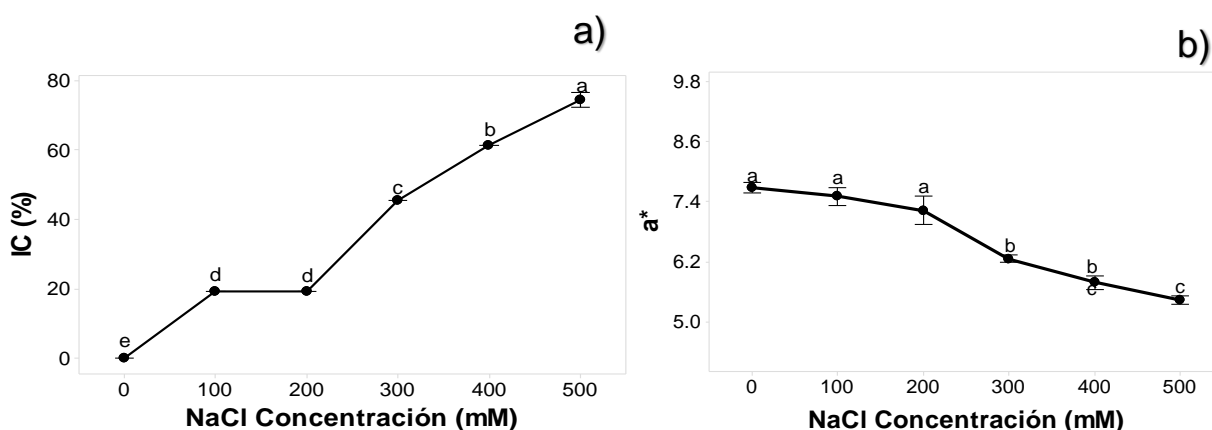


Figura 35. Efecto de la concentración en emulsiones dobles. a) Índice de cremado, b) a^* . Media \pm desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p<0.05$), mediante prueba de Tukey.

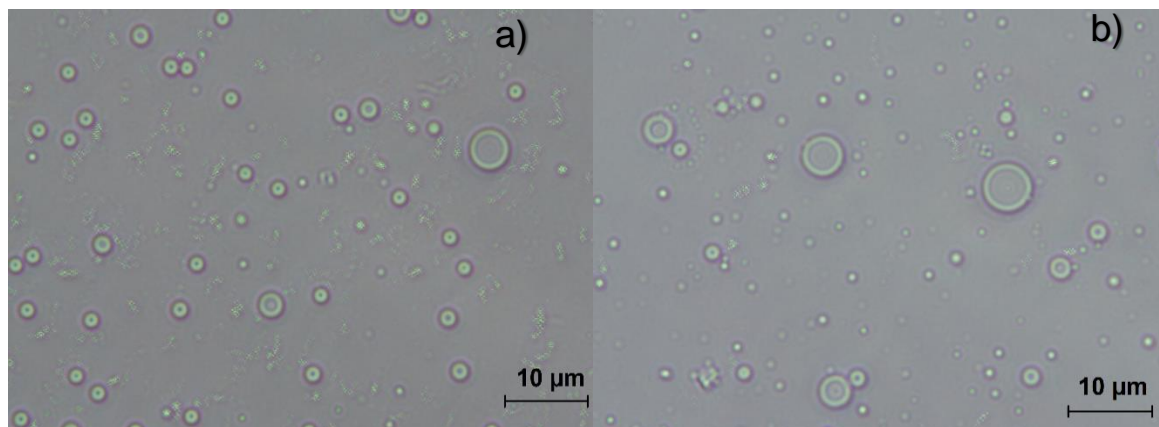


Figura 36. Morfología de gota 100X, dilución 1:100 para emulsiones dobles, muestra control (a) y muestra tratada con solución de NaCl (b).

La evaluación de las emulsiones a distintas condiciones permite tener un indicio del comportamiento de la emulsión en un alimento. Con los resultados obtenidos se determinó que a pesar de que factores como la temperatura y el pH siguen teniendo influencia en la estabilidad de los compuestos de interés, es decir de las betalaínas, les dan un rango más amplio de protección. En el caso de la temperatura, el tiempo de procesamiento es el que jugará un papel determinante al momento de evitar la degradación de los compuestos ya que la separación de fases no ocurre de manera inmediata, y con esto se tiene un punto de oportunidad en la industria de alimentos. En el caso del pH, el rango de estabilidad de la emulsión es bastante amplio, se puede someter la emulsión a pH entre 4-8, evitando cambios significativos en parámetros de color y estabilidad, considerando 4 y 6 los pH más estables. Sin embargo, es importante también conocer los cambios químicos que ocurren en las emulsiones y sobre todo una aproximación al porcentaje de encapsulación de betalaínas.

6.7 Evaluación fisicoquímica de emulsiones dobles.

La estabilidad y eficiencia de las emulsiones dobles es de suma importancia para la encapsulación de compuestos bioactivos como las betalaínas. Para evaluar su estabilidad dentro de las emulsiones ($A=70\%$, $C=0.16\%$, $t=2.24$ min) fueron analizados dos extractos de gámbullo con distinta concentración. El primer extracto consistió en la extracción simple del gámbullo, es decir, extracción acuosa 1:10. Mientras que el extracto concentrado consistió en diluir 0.34 g y 0.51 g de extracto liofilizado en 5 mL para posteriormente formar las emulsiones presentadas en la Figura 37.



Figura 37. Emulsiones simples (a,b) y dobles (c,d) elaboradas con extracto simple (a,c) y concentrado (b,d) de gámbullo.

El color del extracto simple estaba dado por un parámetro L^* de 26.47 ± 0.08 , lo que nos dice que existe una mayor tendencia al color negro. El parámetro a^* tenía un valor de 29.87 ± 0.11 , lo que indica una clara tendencia a la coloración roja. Mientras que el parámetro b^* presentó una tendencia a la coloración azul con valores de -3.52 ± 0.04 . La combinación de estos dos últimos parámetros resulta en color magenta (Pagano *et al.*, 2018). Los parámetros de color del extracto concentrado no pudieron ser medidos debido a que solo se contaban con 5 mL de muestra y el resultado no hubiese sido exacto. Después de la elaboración de las emulsiones se realizaron las mediciones de tamaño de gota, color y betalaínas tanto al día 0 y al día 7 de almacenamiento (4°C).

En la Tabla 12, se observan los tamaños de gota tanto para las emulsiones simples como para las emulsiones dobles. Estas últimas no presentan diferencia significativa entre el día 0 y el día 7 de almacenamiento. La misma tendencia fue reportada por Pagano *et al.* (2018) en donde, las muestras almacenadas a 4°C mostraron estabilidad al almacenamiento de 7 días. Sin embargo, sus muestras presentaron una disminución del parámetro a^* de color y un aumento en el parámetro b^* . Tal como ocurrió con el extracto de garambullo, atribuyéndose los cambios a la degradación de betalaínas (Tabla 13). En las secciones anteriores se había determinado que no existía diferencia significativa en el parámetro a^* de color por lo que se decidió utilizar la emulsión completa (15 mL) para la estimación de rendimientos en las emulsiones dobles. Es por esto que no se le realizaron determinaciones a los 7 días de almacenamiento (Tabla 12).

TABLA 12. Tamaño de gota en emulsiones simples y dobles con extractos de garambullo.

Emulsión	D (μm)	D ₇ (μm)
SM-EX	2.21 ± 0.90	NA
SM-CN	2.24 ± 0.90	NA
D-EX	0.93 ± 0.06	1.08 ± 0.13
D-C	0.87 ± 0.06	0.94 ± 0.02

SM-EX= simple con extracto, SM-CN= simple con extracto concentrado, D-EX= doble con extracto, D-CN= doble con extracto concentrado, D= diámetro de gota, D₇= diámetro de gota 7 días de almacenamiento.

En el caso de las emulsiones dobles, a diferencia del extracto sin procesar, no se observó diferencia significativa en los parámetros de color para ambas muestras (Tabla 13), siendo esto positivo para la estabilidad de los compuestos de interés. Lo anterior da un indicio de que las emulsiones dobles son eficientes para la preservación del color, logrando la estabilidad del color durante 7 días. Se esperaría entonces obtener el mismo comportamiento para la concentración de betalaínas, así como para las propiedades químicas de las emulsiones.

TABLA 13. Parámetros de color en emulsiones simples y dobles con extractos de garambullo.

Muestra	Día	L*	a*	b*
Extracto simple	0	26.47 ± 0.08	29.87 ± 0.11	-3.52 ± 0.04
	7	21.13 ± 0.45	3.03 ± 0.06	-2.65 ± 0.29
SM-EX	0	74.07 ± 1.11	23.20 ± 0.70	-4.53 ± 0.02
	7	NA	NA	NA
SM-C	0	58.98 ± 0.13	37.65 ± 0.08	-7.62 ± 0.01
	7	NA	NA	NA
D-EX	0	86.18 ± 1.37	8.17 ± 0.62	-0.85 ± 0.31
	7	86.15 ± 0.51	8.14 ± 0.08	-0.38 ± 0.53
D-C	0	77.67 ± 1.56	16.5 ± 0.77	-4.53 ± 0.71
	7	79.94 ± 0.35	14.76 ± 0.13	-3.12 ± 0.67

* Media ± desviación estándar (n=2). SM-EX= simple con extracto, SM-C= Simple con extracto concentrado, D-EX= doble con extracto, D-C= doble con extracto concentrado. NA= no aplica. Valores sombreados representan diferencia significativa entre muestras ($p < 0.05$) mediante prueba de t-pareada.

En la Tabla 14 se observa el contenido de betalaínas tanto para los extractos como para las emulsiones dobles. Como se había mencionado el extracto simple presentó una degradación de ambos compuestos al día 7 de almacenamiento a 4°C. Ese extracto fue utilizado para la elaboración de emulsiones dobles y se obtuvo una

encapsulación aproximada del 83% para betacianinas y en el caso de las betaxantinas se tuvo un incremento del 68%. Esto indica que durante el procesamiento ya sea por la temperatura o por los efectos del ultrasonido se ocasionó la degradación de las betacianinas, mientras que el incremento en las betaxantinas puede deberse a su formación por la degradación de las betacianinas o por alguna alteración en las muestras debida a los residuos de aceite después del filtrado. Se determinó también el contenido de los compuestos a los 7 días de almacenamiento y se calcularon los porcentajes de retención de betalaínas, siendo 66.13 ± 8.46 % para betacianinas y 47.41 ± 4.4 % para betaxantinas, teniendo una diferencia significativa al día 0 y al día 7 de almacenamiento.

TABLA 14. Contenido de betalaínas en extractos y muestras de emulsiones dobles.

Muestra	BC (mg/g)	BX (mg/g)	BC (mg/g)	BX (mg/g)
	Día 0	Día 0	Día 7	Día 7
Extracto simple	$2.00 \pm 0.07^*$	$0.63 \pm 0.02^*$	$0.53 \pm 0.23^*$	$0.24 \pm 0.01^*$
D-EX	$1.67 \pm 0.12^*$	$0.97 \pm 0.14^*$	$1.10 \pm 0.19^*$	$0.45 \pm 0.07^*$
Concentrado	4.31 ± 0.72	1.57 ± 0.20	NA	NA
D-C	2.94 ± 0.13	$0.90 \pm 0.06^*$	2.14 ± 0.22	$0.63 \pm 0.00^*$

Media \pm desviación estándar (n=3). BC=betacianinas, BX= betaxantinas. D-EX= doble con extracto, D-C= doble con extracto concentrado. * Indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante prueba de t-pareada entre el día 0 y día 7.

Por otro lado, se determinó también el contenido de betalaínas en el extracto concentrado para posteriormente formar emulsiones dobles. Esas emulsiones tuvieron un porcentaje de encapsulación aproximado de 68 y 57% para betacianinas y betaxantinas, respectivamente. A los 7 días se tuvo un porcentaje de retención del 72% y el 70% por lo que la mayor pérdida de los compuestos ocurre durante el procesamiento. Sin embargo, se demostró que la estabilidad de los compuestos es mayor en las emulsiones dobles que en el extracto sin procesamiento y que se puede

llegar a tener un porcentaje de encapsulación de betacianinas del 83% al día 0 o 70% al día 7 de almacenamiento a 4°C. La diferencia en porcentajes de encapsulación que existió entre los extractos puede deberse a alteraciones en las mediciones por los residuos de los otros componentes presentes en la emulsión, pero en ambos casos las betacianinas presentan estabilidad en el almacenamiento. Kaimanen *et al.* (2015) muestran resultados similares para la encapsulación de betalaína, logrando un porcentaje de encapsulación de 89%, mencionando que la eficacia de la encapsulación depende de la composición de todo el sistema y de las propiedades de los ingredientes encapsulados.

TABLA 15. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en emulsiones dobles con extracto de garambullo.

Muestra	AA. Día 0	AA. Día 7	PT. Día 0	PT. Día 7
Extracto	1.57 ± 0.01*	ND*	6.68 ± 0.32	5.49 ± 0.62
D-EX	0.61 ± 0.01*	1.34 ± 0.04*	4.46 ± 0.10*	2.62 ± 0.23*
D-C	4.43 ± 0.07	3.31 ± 0.53	43.77 ± 1.13*	26.11 ± 2.36*

AA: actividad antioxidante (mmol ET/100g b.s*), PT: Polifenoles totales (mg EAG/100g b.s*), ND: No detectable. D-EX= doble con extracto, D-C= doble con extracto concentrado. * indican diferencia significativa entre muestras (p<0.05) mediante prueba de t-pareada.

Uno de los puntos de interés de utilizar las betalaínas como pigmentos en la industria de alimentos a parte de su coloración, son también las propiedades antioxidantes que contienen. Es por esto que se determinaron los cambios químicos que ocurrieron en las emulsiones durante el procesamiento y el almacenamiento, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 15. La actividad antioxidante del extracto de garambullo a 7 días de almacenamiento presentó una diferencia significativa respecto al día 0, evidenciándose su degradación. Caso contrario para los polifenoles, los cuales muestran estabilidad 7 días después. En el caso de las emulsiones W/O/W con extracto simple, se presentó un incremento en la actividad antioxidante al día 7 respecto a los valores del día 0, sin embargo, esto puede atribuirse a que no existió

una separación completa de la emulsión al día 0 y con ello la disponibilidad de los compuestos causantes de la actividad antioxidante no pudieron ser detectados (Leiva-Vega *et al.*, 2020). Sin embargo, al comparar con el extracto, si existe una degradación en la actividad antioxidante por procesamiento, teniendo una encapsulación del 85% en 7 días de almacenamiento. Por otro lado, en las muestras realizadas con extracto concentrado se obtuvo estabilidad en la actividad antioxidante a 7 días de almacenamiento a 4°C. Caso contrario para ambas muestras de extractos en polifenoles, los cuales mostraron degradación a los 7 días de almacenamiento e incluso se observa degradación por procesamiento al comparar con el extracto sin tratamiento. Lo que nos dice que el ultrasonido tiene un efecto negativo en la presencia de estos compuestos y son susceptibles a degradación a través del tiempo, pero en el caso de la actividad antioxidante las emulsiones son efectivas para mantener la estabilidad. En este caso se obtuvo una retención del 59% en emulsiones dobles con extracto simple y 60% para extracto concentrado. Estos resultados fueron muy cercanos a lo reportado por Niknam *et al.* (2020), quienes encapsularon polifenoles con una retención del 68%, y la actividad antioxidante en un 89%.

Como se había mencionado, la estabilidad de las betacianinas y betaxantinas está dada por alteraciones en temperatura, pH y concentraciones y se ha demostrado que las betacianinas tienen una mayor estabilidad que las betaxantinas. Sin embargo, se decidió realizar su estudio por separado para determinar si existía diferencia en la estabilidad de los compuestos de manera individual en emulsiones dobles.

6.8 Separación de betalaínas y elaboración de emulsiones dobles.

Como se ha mencionado, las betalaínas se dividen en dos grupos, betacianinas y betaxantinas, las cuales absorben a diferente longitud de onda, tal como se observa en la Figura 38, en una muestra de extracto de betabel, en donde las betaxantinas se observan a 480 nm, mientras que las betacianinas a 538 nm. Esto depende del tipo de muestra a analizar ya que en la Figura 39 se tiene una muestra de extracto de garambullo en la que solo se observa el pico de las betacianinas a 536 nm, lo que indica que el contenido de betaxantinas de la muestra puede ser muy bajo. Para observar detalladamente los compuestos se analizaron las muestras de ambos extractos por HPLC y así poder determinar cuál sería la mejor opción al momento de la separación de las betalaínas.

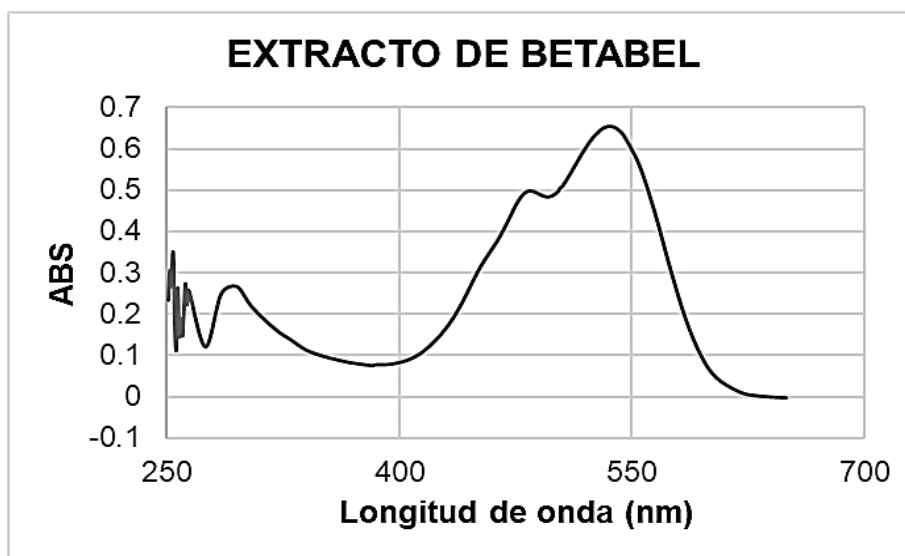


Figura 38. Barrido espectrofotométrico de extracto de betabel.

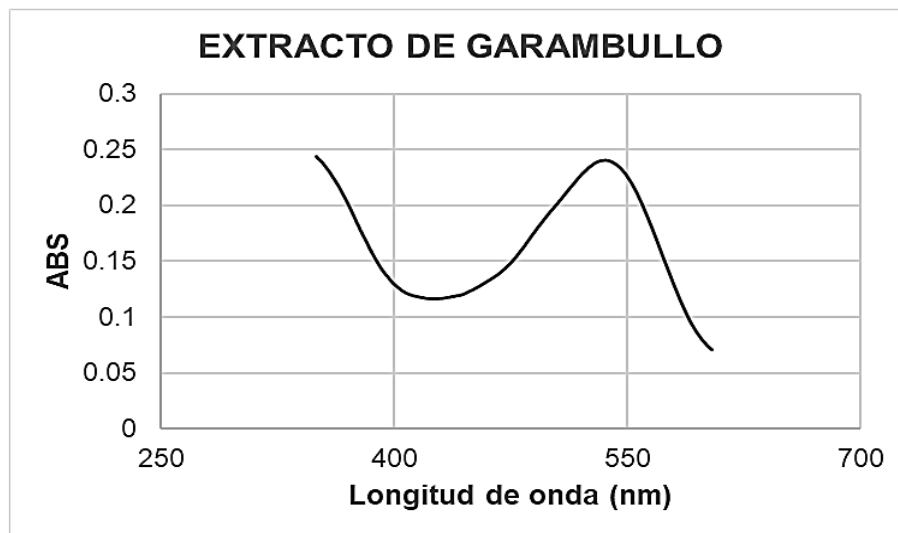


Figura 39. Barrido espectrofotométrico de extracto de grombulla.

En la Figura 40, se observa que en una longitud de onda de 536 para extracto de grombulla se obtuvieron dos picos mayoritarios, el primero en un tiempo de retención de 3.23 min con un área de 30.55 mAU*min y el segundo a los 6.229 min. También se observan dos picos menores en un tiempo de retención de 4.49 y 8.06 min. En el caso de la longitud de onda de 481 nm (Figura 41) se observa un pequeño pico en el tiempo de retención de 3.006 con un área de 0.8719 mAU*min, con lo que se demuestra el poco contenido de betaxantinas en las muestras de grombulla. En la Figura 42, se presenta el cromatograma de 2500 ppm de estándar de betanina, observándose dos picos mayoritarios (3.18 y 4.64 min), que pertenecen a la betanina e isobetanina. Por lo que los resultados obtenidos coinciden con el estándar. Reynoso *et al.* (1999) reportan que a 535 nm, para extracto de grombulla se observan 4 picos, indicaxantina (1.20 min), phyllocactina (2.02 min), betanina (2.60 min) e isobetanina (4.62 min), siendo la betanina el pico mayoritario. De la misma manera Chethana *et al.* (2007) hacen una identificación de betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina a 4.02, 4.91, 6.97, 8.72 min respectivamente, todos estos a 540 nm. Mientras que a 480 nm se identifican la vulgaxantina I y vulgaxantina II a tiempos de retención de 2.38 y 3.52 min respectivamente.

Por otro lado, al introducir la muestra de extracto de betabel en una longitud de onda de 538 nm se obtuvo un pico mayoritario en un tiempo de retención de 4.47 min con un área de 89.52 mAU*min (Figura 43). Los resultados obtenidos para una longitud de onda de 483 se muestran en la Figura 44 en donde se muestra un pico de menor tamaño en un tiempo de retención de 3.87 min, observándose únicamente en esta longitud de onda, por lo que se considera una betaxantina. En los extractos de betabel se han estudiado una gran variedad de betalaínas, siendo la betanina, isobetanina y vulgaxantina las más comunes (Sawicki *et al.*, 2016).

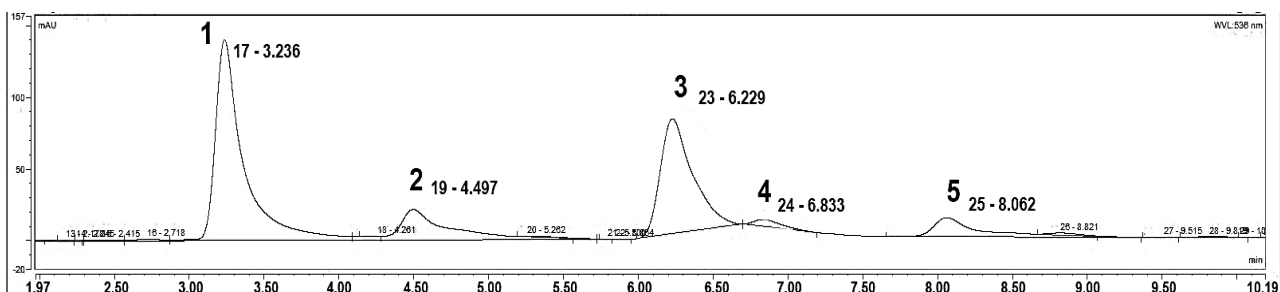


Figura 40. Cromatograma de extracto de garambullo 536 nm. 1) Betanina, 2) isobetanina, 3) betanidina, 5) isobetanidina.

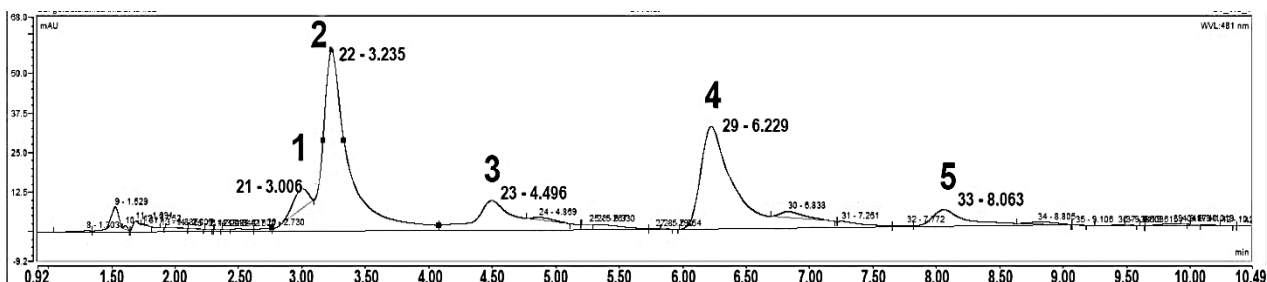


Figura 41. Cromatograma de extracto de garambullo 481 nm. 1) indicaxantina, 2) Betanina, 3) isobetanina, 4) betanidina, 5) isobetanidina.

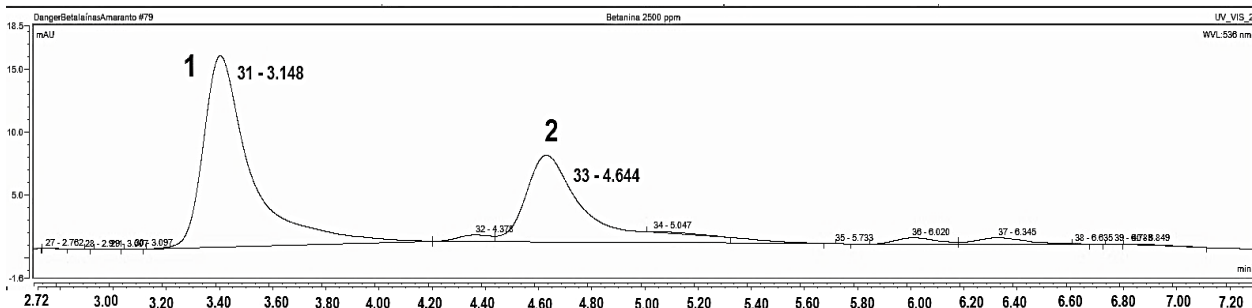


Figura 42. Cromatograma de estándar de betanina (2500 ppm) 536 nm. 1) Betanina, 2) isobetanina.

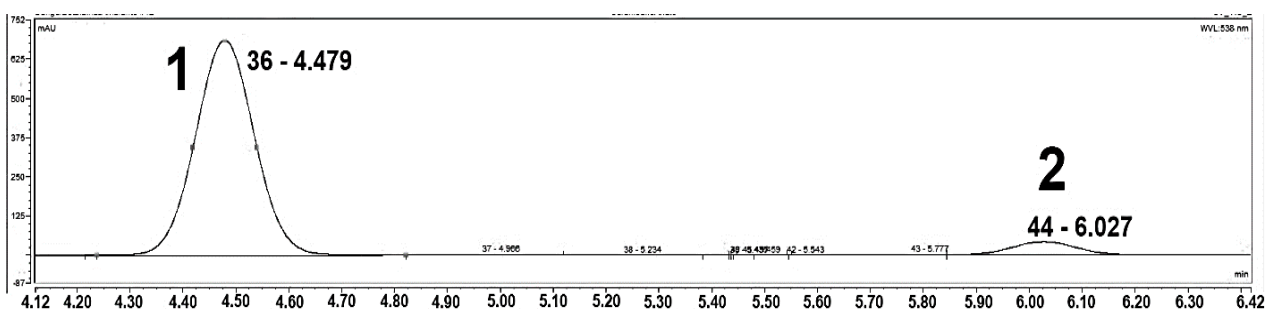


Figura 43. Cromatograma de extracto de betabel 538 nm. 1) betanina, 2) betanidina.

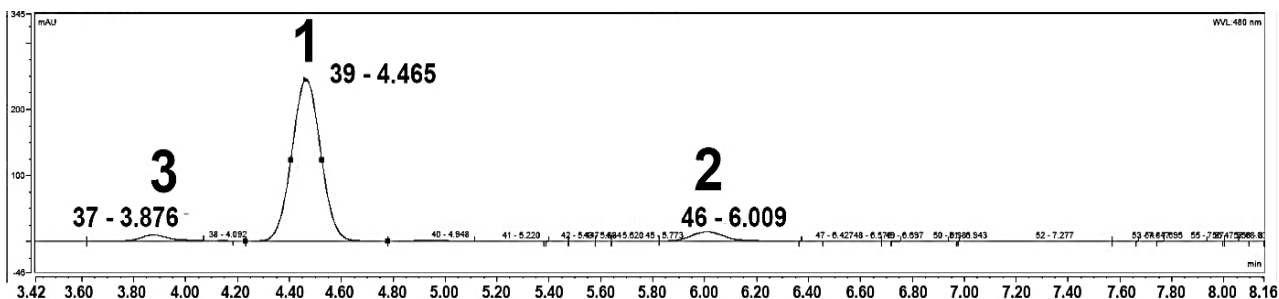


Figura 44. Cromatograma de extracto de betabel 480 nm. 1) betanina, 2) betanidina, 3) indicaxantina.

Con los cromatogramas de los extractos se puede decir que ambas muestras presentan como pico mayoritario la betanina (betacianina) y que en el caso del betabel el pico de las betaxantinas se observa con mayor claridad. Sin embargo, para determinar la concentración de betalaínas en cada uno de los extractos se realizó la

cuantificación y así poder determinar cuál sería factible para separación (Tabla 16). Con estos resultados se determinó que en el extracto de betabel el contenido de betaxantinas es mucho mayor que en garambullo, teniendo 3.88 mg BX/g b.s y 0.63 mg BX/g b.s respectivamente, por lo que se decidió realizar la separación de betalaínas de betabel para después evaluarlas en emulsiones dobles.

TABLA 16. Contenido de betalainas en extracto de betabel y garambullo.

Parámetro	Betabel*	Garambullo*
Betacianina (mg BC/g b.s*)	6.02 ± 0.04	2.00 ± 0.07
Betaxantina (mg BX/g b.s*)	3.89 ± 0.02	0.63 ± 0.02

*Media ± desviación estándar; BC = Equivalentes Betacianinas; BX = Equivalentes de Betaxantinas

La separación de betalaínas se realizó con una placa de celulosa cristalina y una mezcla de 2-propanol: etanol: agua: ácido acético (55:20:20:5) (Figura 45). El rendimiento de la separación fue de 83.08 ± 0.07 %, de los cuales un 56.48 ± 6.39 % correspondía a las betacianinas y un 26.61 ± 6.47 % a las betaxantinas. Los extractos liofilizados fueron diluidos en 5mL para posteriormente someterlos a las emulsiones dobles. Se realizó el barrido espectrofotométrico observando los picos correspondientes a 479 y 536 nm (Figura 46 y 47). En la cromatografía de HPLC a 536 nm (Figura 48) se muestran los picos correspondientes a las betacianinas propias del betabel. En el caso de los cromatogramas a 481 nm se observa con mayor claridad el contenido de betaxantinas con un pico en 2.96 min (Figura 51). En ambos casos no ocurrió la separación completa de los compuestos, presentándose en cada extracto ambas betalaínas, sin embargo el color y el contenido de betacianinas y betaxantinas en cada caso es notable.

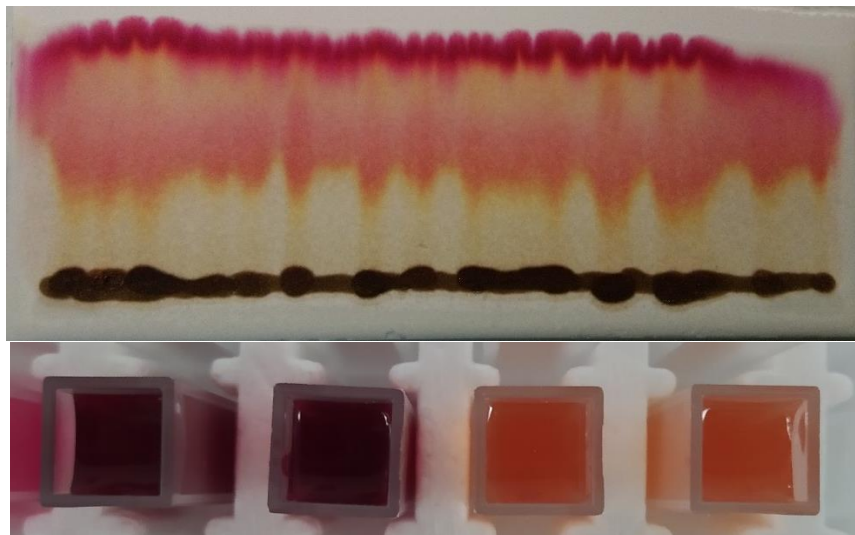


Figura 45. Separación de fases de extracto de betabel.

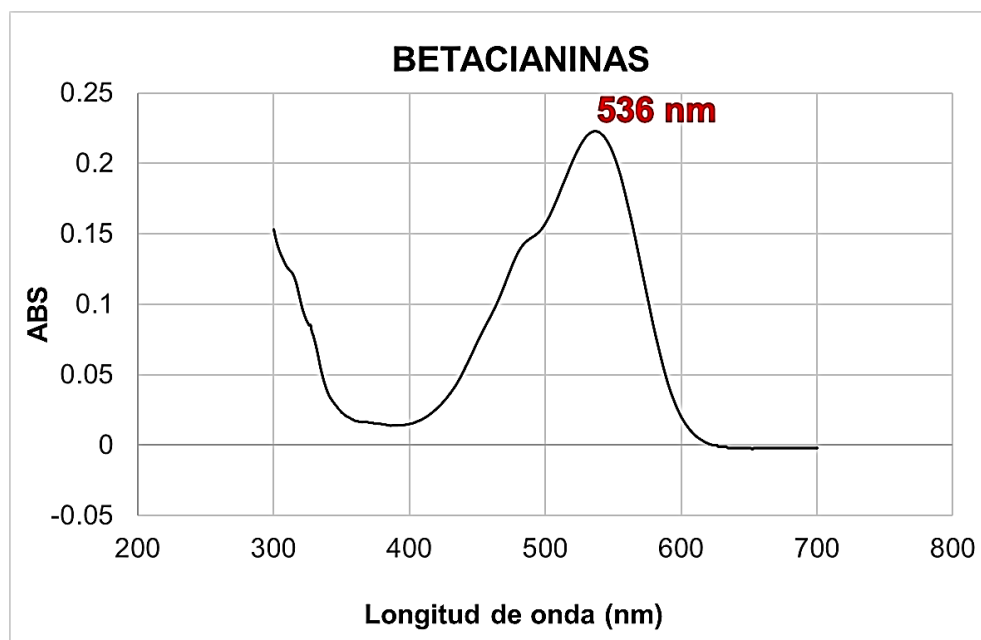


Figura 46. Barrido espectrofotométrico para betacianinas.

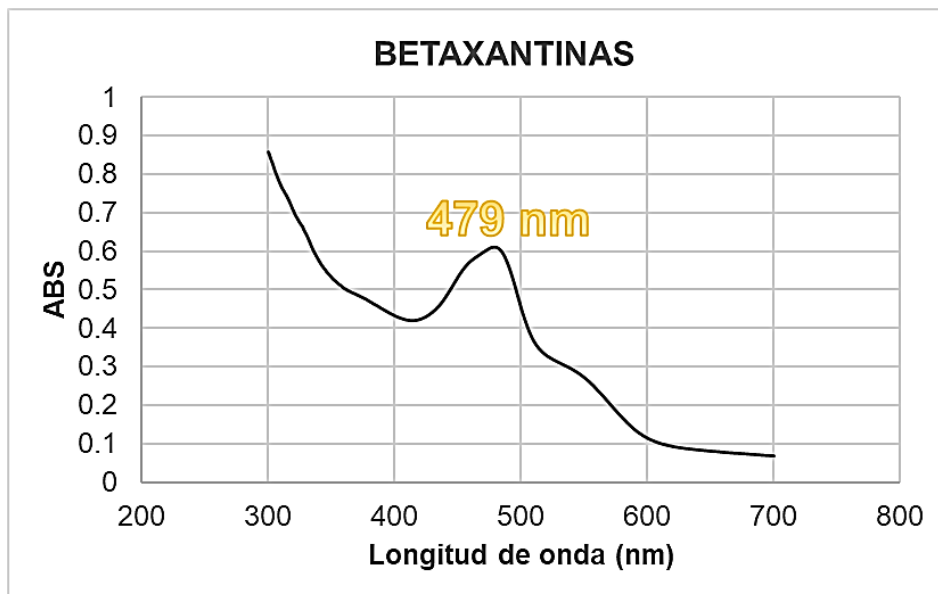


Figura 47. Barrido espectrofotométrico para betaxantinas.

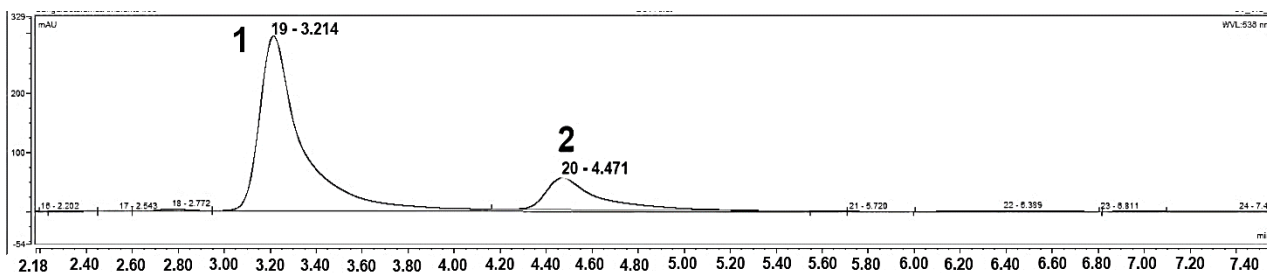


Figura 48. Cromatograma de extracto de betacianinas 536 nm. 1) betanina, 2) isobetanina.

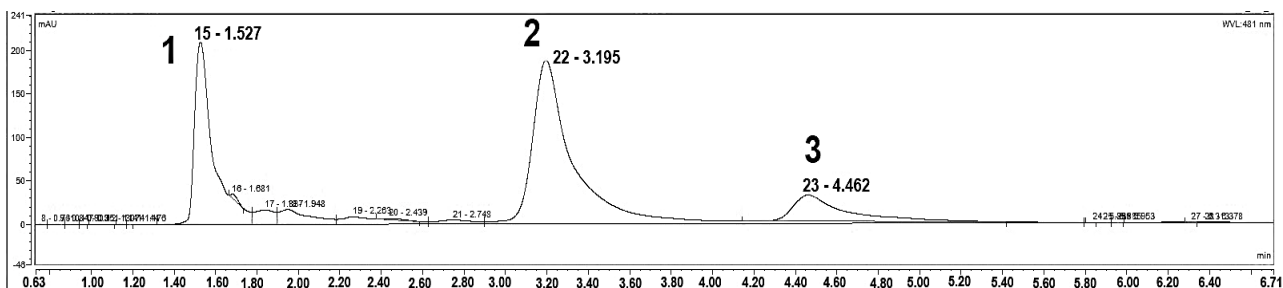


Figura 49. Cromatograma de extracto de betacianinas 481 nm. 2) betanina, 3) isobetanina.

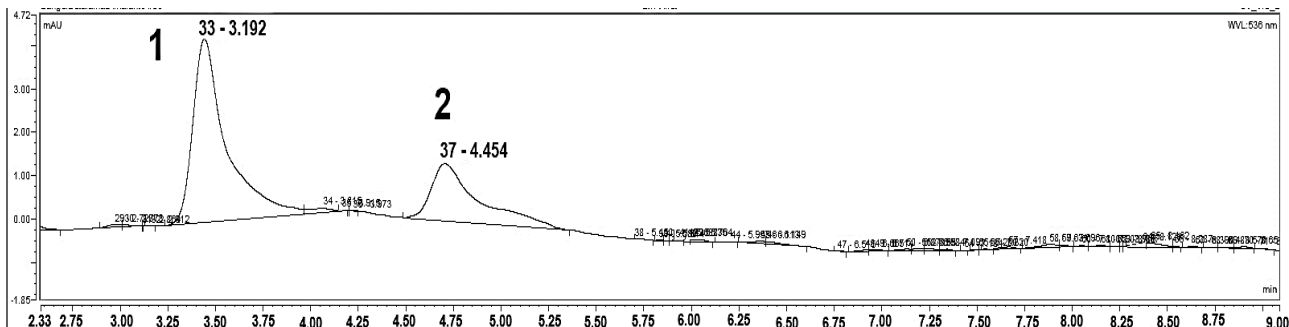


Figura 50. Cromatograma de extracto de betaxantinas 536 nm. 1) betanina, 2) isobetanina.

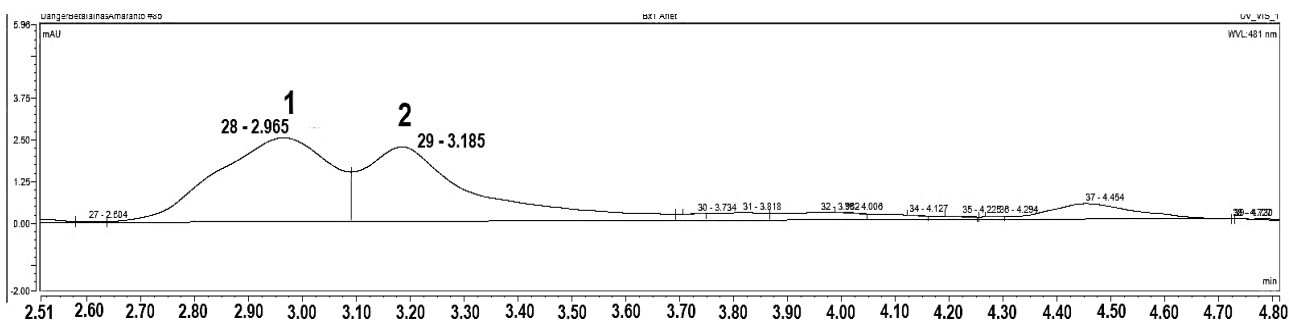


Figura 51. Cromatograma de extracto de betaxantinas 481 nm. 1) indicaxantina, 2) betanina

6.8.1 Emulsiones dobles con extracto de betacianinas y betaxantinas.

Para determinar la estabilidad de las betalaínas de manera individual, es decir betacianinas y betaxantinas, se realizaron emulsiones dobles con las condiciones óptimas de procesamiento estudiadas en las secciones anteriores. Las emulsiones con extracto de betacianinas presentaron un tamaño de gota de $0.92 \pm 0.09 \mu\text{m}$, mientras que las elaboradas con betaxantinas tenían un diámetro de gota de $0.90 \pm 0.04 \mu\text{m}$. El análisis de t-pareada muestra que no existe diferencia significativa entre emulsiones atribuido al tipo de pigmento utilizado. En cuanto a la morfología de gota puede observarse que las muestras con betacianinas presentan una coloración rosa (Figura 51a), mientras que las emulsiones elaboradas con betaxantinas presentan coloración amarilla y algunas gotas de color rosa (Figura 51c,d).

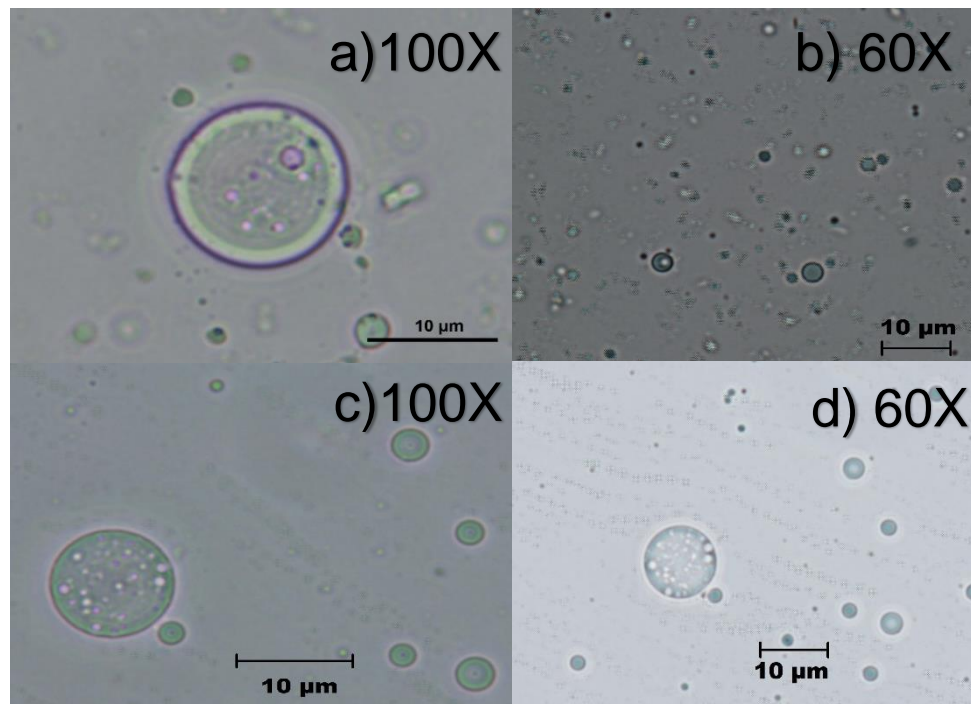


Figura 52. Morfología de gota de emulsiones dobles con extracto de betacianinas (a,b) y betaxantinas (c,d).

Para determinar la estabilidad de las betacianinas y betaxantinas en emulsiones dobles (Figura 52) se midió el índice de cremado, los parámetros de color tanto al día 0 y al Día 7, así como la concentración de betalaínas. El índice de cremado para todas las emulsiones fue de 0%, lo que indica estabilidad en almacenamiento. Por otro lado, para la concentración de betalaínas, en la Tabla 17 se observa que existe una diferencia significativa para todas las muestras a los 7 días de almacenamiento, observándose una disminución de ambos compuestos. Sin embargo, en los parámetros de color, las emulsiones elaboradas con betaxantinas presentan mayor estabilidad en los parámetros L^* y a^* , e incluso existe un incremento en el parámetro b^* a los 7 días de almacenamiento, atribuido a la liberación de betaxantinas. Con esto se podría decir que las betacianinas presentan mayor estabilidad al utilizarse en extracto sin separación ya que su porcentaje de retención fue del 80% y de manera individual es del 61%. Mientras que las betaxantinas si podrían encapsularse de manera individual, teniendo un porcentaje de retención del 82%, lo que permitiría

usarlas como pigmento. Dado que no hay estudios de emulsiones en los que se utilicen las betaxantinas de forma individual, es necesario estudiar de manera más extensa las emulsiones en distintas condiciones de procesamiento para determinar si es factible la encapsulación individual.



Figura 53. Emulsiones dobles con a) betacianinas y b) betaxantinas.

TABLA 17. Evaluación de emulsiones dobles con betacianinas y betaxantinas.

Parámetro	Emulsión betacianina		Emulsión betaxantina	
	(Día 0)	(Día 7)	(Día 0)	(Día 7)
Betacianina*	4.75 ± 0.21*	2.91 ± 0.14*	0.09 ± 0.03*	0.03 ± 0.00*
Betaxantina*	1.73 ± 0.04*	1.42 ± 0.10*	0.13 ± 0.03*	0.10 ± 0.03*
L*	80.68 ± 0.52*	81.89 ± 1.04*	89.00 ± 1.43	89.66 ± 1.65
a*	11.92 ± 0.56*	11.52 ± 0.54*	0.60 ± 0.18	0.58 ± 0.17
b*	-1.13 ± 0.15*	-0.69 ± 0.17*	2.66 ± 0.42*	3.01 ± 0.37*

Media ± desviación estándar (n=2); BC = Equivalentes Betacianinas (mg BC/g b.s*); BX = Equivalentes de Betaxantinas (mg BX/g b.s). * indican diferencia significativa entre muestras del día 0 y día 7 (p<0.05) mediante prueba de t pareada.

VII. CONCLUSIONES

El garambullo es una de las fuentes de betalaínas mostrando en su extracto un contenido de 2.73 mg/g b.s de betalaínas totales, con una tendencia al color magenta. Este extracto fue utilizado para el desarrollo de emulsiones. Sin embargo, en este estudio se determinó que su contenido de betaxantinas es muy bajo (0.85 ± 0.07 mg BX/g b.s), por lo que para la separación de betalaínas en betacianinas y betaxantinas era necesario el uso de fuentes con mayor contenido de estos compuestos y así tener un mayor rendimiento. Es por esto que para la separación se optó por utilizar extracto liofilizado de betabel, teniendo rendimientos de 56% y 26% para betacianinas y betaxantinas, respectivamente.

En el desarrollo de emulsiones simples, en la selección de emulsificante, se determinó que el uso de mezclas de tensoactivos permite una mayor estabilidad debido al equilibrio que puede lograrse entre fases, por las características estructurales de los compuestos, por lo que, basados en las características morfológicas, en el menor tamaño de gota (1.91 μm), el bajo índice de cremado (50%) y estabilidad de color, se decidió utilizar la mezcla Span 80:Tween 40.

Uno de los factores que tiene mayor influencia en el desarrollo de emulsiones es la temperatura y se encuentra relacionado con el método de homogenización. Observando que a mayor amplitud de sonicación se tiene un aumento en la temperatura, y con ello, una desestabilización del sistema. En este caso, se determinó que para la elaboración de emulsiones simples W/O fue necesario utilizar una homogenización inicial con Ultra Turrax a 15 500 rpm, manteniendo temperaturas entre 30-40°C, durante 10 min. Posteriormente una amplitud de sonicación de 30% ($I=935$ W/L), durante 1 min para obtener la mayor estabilidad durante el almacenamiento. Es decir, que no presentaran separación de fases, logrando un índice de cremado del 0% y un tamaño de gota de 1.85 μm .



Por otro lado, en emulsiones dobles (W/O/W) mediante un análisis de optimización y con la verificación del modelo se determinó que utilizando concentraciones de 0.16% de quillaja saponaria y una amplitud del 73% (2.24 min) se logró la mayor estabilidad tanto de las fases como en el color de los pigmentos. Con estas condiciones se obtuvo un diámetro de gota de 0.8 μm , lo que es considerado como una emulsión nanométrica. Los resultados obtenidos indican que se puede implementar el uso de emulsificantes naturales como la quillaja saponaria (saponinas), logrando emulsiones estables, con características similares a las elaboradas con compuestos sintéticos y al mismo tiempo agregar propiedades que les den mayor funcionalidad.

Las emulsiones dobles fueron evaluadas fisicoquímicamente y se determinó que no existe diferencia significativa en el diámetro de gota al día 7 de almacenamiento, así como en los parámetros de color. En el caso de las betalaínas se tuvieron porcentajes de retención a los 7 días de 66% y 47% para betacianinas y betaxantinas respectivamente, mucho mayor a lo encontrado en el extracto sin encapsular. Sin embargo, los métodos de homogenización si influyen en la retención de los compuestos ya que se observó una disminución de los mismos, inmediatamente después de ser elaboradas las emulsiones. Esto mismo se observó en la actividad antioxidante y en el contenido de polifenoles totales de las emulsiones, ya que se tiene una clara degradación de estos compuestos. Sin embargo, la actividad antioxidante se mantiene estable durante el almacenamiento.

Al evaluar las emulsiones dobles en distintas condiciones se determinó que la temperatura y el pH siguen siendo factores muy importantes en la estabilidad de las betalaínas. Sin embargo, la liberación de los compuestos al encontrarse encapsulados ocurre de manera controlada, es decir, se puede aumentar la temperatura a 60 °C durante periodos cortos de tiempo y disminuir la degradación. Así como el utilizar las emulsiones en un pH entre 4 y 8 para evitar cambios significativos en los pigmentos. Esto nos dice que, el desarrollo de emulsiones como método de encapsulación es efectivo para retardar la degradación de los compuestos de interés, tanto en almacenamiento como en procesamiento.



Las betaxantinas tienen una mayor retención de forma individual que las betacianinas (82% y 61% respectivamente). Sin embargo, es necesario un estudio más a fondo que permita conocer si se tendrían los mismos cambios a diferentes condiciones de procesamiento, en donde se determine si la encapsulación de betaxantinas permite tener una mayor estabilidad en cambios de pH y temperatura, logrando con esto utilizar el pigmento amarillo en la elaboración de alimentos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. *Food Engineering Reviews*, 5(3), 139–157. doi:10.1007/s12393-013-9066-3

Anal, A., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18, 240-251. doi:10.1016/j.tifs.2007.01.004

Akbar, E., Sadiq, Z., & Zia-UI-Haq, M. (2018). Betalains: Biomolecular Aspects. doi:10.1007/978-3-319-95624-4

AOAC (1998). *Official methods of analysis* (16 ed.). Arlington, VA: AOAC International

Azeredo, H., Santos, A., Souza, A., Mendes, K., & Andrade, M. (2007) Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract, *American J. Food Technol.* 2, 307–312. DOI: 10.3923/ajft.2007.307.312

Azeredo, H. (2008). Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2365–2376. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x

Balcaen, M., Steyls, J., Schoeppe, A., Nelis, V., & Van der Meeren, P. (2020). Phosphatidylcholine-depleted lecithin: a clean-label low-HLB emulsifier to replace PGPR in w/o and w/o/w emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. doi:10.1016/j.jcis.2020.07.149

Badui, S. (2013). *Química de los alimentos*. Pearson Educación. México.

Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI–polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294(1-3), 20–32. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.07.056



Bilyk, A. (1981). Thin-Layer Chromatographic Separation of Beet Pigments. *Journal of Food Science*, 46(1), 298–299. doi:10.1111/j.1365-2621.1981.tb14588.x

Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A., & Livrea, A. (2002). Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6895–6901. doi:10.1021/jf025696p

Brand-Williams, M. (1995). Use Of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28.25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2011). Emulsifying Properties of Different Modified Sunflower Lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 355–361. doi:10.1007/s11746-011-1915-8

Cai, Y., & Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, 65(7), 1248–1252. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x

Cai, M., & Corke, H. (2001). Identification and Distribution of Simple and Acylated Betacyanins in the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1971–1978. doi:10.1021/jf000963h

Calva-Estrada, S. de J., García, O., Mendoza, M. R., & Jiménez, M. (2017). Characterization of O/W emulsions of carotenes in blackberry juice performed by ultrasound and high-pressure homogenization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 39(2), 181–189. doi:10.1080/01932691.2017.1306783

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



Castellar, R., Obon, J., Alacid, M., & Fernández-López, J. (2003). Colour properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2772–2776. doi:10.1021/jf021045h

Cheok, C., Salman, H., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16–40. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.057

Chethana, S., Nayak, C. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 679–687. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.12.021

Cho, Y.-H., Kim, S., Bae, E. K., Mok, C. K., & Park, J. (2008). Formulation of a Cosurfactant-Free O/W Microemulsion Using Nonionic Surfactant Mixtures. *Journal of Food Science*, 73(3), E115–E121. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00688.x

Chung, C., Koo, C. K. W., Sher, A., Fu, J.-T. R., Rousset, P., & McClements, D. J. (2019). Modulation of caseinate-stabilized model oil-in-water emulsions with soy lecithin. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2019.04.032

Chung, C., Sher, A., Rousset, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2017). Formulation of food emulsions using natural emulsifiers: Utilization of quillaja saponin and soy lecithin to fabricate liquid coffee whiteners. *Journal of Food Engineering*, 209, 1–11. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.04.011

Comunian, T., Ravanfar, R., Alcaine, D., & Abbaspourrad, A. (2018). Water-in-oil-in-water emulsion obtained by glass microfluidic device for protection and heat-triggered release of natural pigments. *Food Research International*, 106, 945–951. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.008

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289. doi:10.1080/10408690091189257



Dhamodharan, P., & Bakthavatsalam, A. K. (2020). Experimental investigation on thermophysical properties of coconut oil and lauryl alcohol for energy recovery from cold condensate. *Journal of Energy Storage*, 31, 101639. doi:10.1016/j.est.2020.101639

Drelich, A., Gomez, F., Clause, D., & Pezron, I. (2010). Evolution of water-in-oil emulsions stabilized with solid particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 365(1-3), 171–177. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.01.042

El-Wahab, H., & Moram, G. (2012). Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(2), 224–232. doi:10.1177/0748233711433935

El Zaafarany, G. M., Awad, G. A. S., Holayel, S. M., & Mortada, N. D. (2010). Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 397(1-2), 164–172. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.034

Entezari, M. H., & Ghows, N. (2011). Micro-emulsion under ultrasound facilitates the fast synthesis of quantum dots of CdS at low temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 127–134. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.04.001

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

Faridi Esfanjani, A., Jafari, S. M., & Assadpour, E. (2017). Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221, 1962–1969. doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.149

Fennema, O. (2008). *Food Chemistry*. Taylor y Francis Group, LLC.

García-Barrera, F., Reynoso, C., & González, E. (1998). Estabilidad de las betalaínas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Science and Technology International* 4, 115-120. doi:10.1177/108201329800400206



García, L., Salinas, Y., & Valle, S. (2012). Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en Pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Revista fitotecnia mexicana*, 35(spe5), 01-05.

García, K., Méndez, L., Rodríguez, J., Campanella, O., Patel, B., & Barriada, G. (2016). Physical properties of spray dried *Stenocereus griseus* Pitaya juice powder. *Journal of Food Process Engineering*, April, 1-9. doi:10.1111/jfpe.12470

Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona F, & Escribano, J. (2010). Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal Agricultural Food Chemistry* 58: 10646-10652. doi: 10.1021/jf101695f

Gouin, S. (2004). Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330–347. doi:10.1016/j.tifs.2003.10.005

Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., & Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 466–474. doi:10.1016/j.ultsonch.2017.10.011

Gurfinkel, D., & Rao, A. (2003). Soyasaponins: The Relationship Between Chemical Structure and Colon Anticarcinogenic Activity. *Nutrition and Cancer*, 47(1), 24–33. doi:10.1207/s15327914nc4701_3

Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in colloid and interface science*, 128, 227-248. doi:10.1016/j.cis.2006.11.021

Guzmán-Maldonado, S., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., & Brat, P. (2010). Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilized fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food Chemistry* 121, 381–386. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.039



Hakansson, A., & Hounslow, M. J. (2013). Simultaneous determination of fragmentation and coalescence rates during pilot-scale high-pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 116(1), 7–13. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.11.002

Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 39(6), 667–677. doi:10.1016/j.foodres.2006.01.004

Hernández-López, D., Vaillant, F., Reynoso-Camacho, R., & Guzmán-Maldonado, S. (2008). *Myrtillocactus* (cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruits. *Fruits*, 63(5), 269–276. doi:10.1051/fruits:2008042

Herrera-Hernández, M., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R., & Guzmán-Maldonado, S. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 129, 1744–1750. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.042

Hostettmann, K., and Marston, A. 1995. *Saponins*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

Huang, A., & Elbe, V. (1987). Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *Journal of Food Science*, 52(6), 1689–1693. doi:10.1111/j.1365-2621.1987.tb05907.x

Iqbal, M., Valour, J.-P., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014). Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. *Colloid and Polymer Science*, 293(3), 861–873. doi:10.1007/s00396-014-3464-9

Jafari, S., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. *Drying Technology*, 26(7), 816–835. doi:10.1080/07373930802135972

Kha, T., Nguyen, M., & Roach, P. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering* 98: 385-392. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016.

Kim, S., Park, S., Kang, S., Kang, H., Oh, H., Bae, C., & Bae, D. (2003). Hypocholesterolemic property of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts in human body. *Archives of Pharmacal Research*, 26(12), 1042–1046. doi:10.1007/bf02994756

Komaiko, J., Sastrosubroto, A., & McClements, D. J. (2015). Formation of Oil-in-Water Emulsions from Natural Emulsifiers Using Spontaneous Emulsification: Sunflower Phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 10078–10088. doi:10.1021/acs.jafc.5b03824

Knoth, A., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2005). Stability of water-in-oil-emulsions containing phosphatidylcholine-depleted lecithin. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 635–640. doi:10.1016/j.foodhyd.2004.10.024

Lee, D. W., Hwang, S. J., Park, J. B., & Park, H. J. (2003). Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 20(2), 179–192. doi:10.3109/02652040309178060

Leiva-Vega, J., Villalobos-Carvajal, R., Ferrari, G., Donsì, F., Zúñiga, R. N., Shene, C., & Beldarraín-Iznaga, T. (2020). Influence of interfacial structure on physical stability and antioxidant activity of curcumin multilayer emulsions. *Food and Bioproducts Processing*. doi:10.1016/j.fbp.2020.01.010

León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & Leon, J. (2006). Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084–1091. doi:10.1016/j.foodres.2006.03.006

Leong, T. Ashokkumar, M., & Kentish, S. (2011). The fundamentals of power ultrasound—A review. *Acoustics Australia* 39(2): 54–63.

Levy, G., & Anello, J. A. (1969). Effect of Polysorbate Hydrolysis Products on Biologic Membrane Permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(4), 494–495. doi:10.1002/jps.2600580426

Li, Y., Wu, C., Wu, T., Wang, L., Chen, S., Ding, T., & Hu, Y. (2018). Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. *Journal of Food Engineering*, 217, 108–114. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.08.026

Li, Yujie., Xiang, Dong., Wang, Bo., & Gong, Xiaoyue. (2019). Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Ultrasonic Degraded Polysaccharide Complex. *Molecules* 24, no. 6: 1097. <https://doi.org/10.3390/molecules24061097>

Liu, J., Kharat, M., Tan, Y., Zhou, H., Mundo, J. L. M., & McClements, D. J. (2020). Impact of fat crystallization on the resistance of W/O/W emulsions to osmotic stress: Potential for temperature-triggered release. *Food Research International*, 109273. doi:10.1016/j.foodres.2020.109273

Liu, J., Tan, Y., Zhou, H., Muriel Mundo, J. L., & McClements, D. J. (2019). Protection of anthocyanin-rich extract from pH-induced color changes using water-in-oil-in-water emulsions. *Journal of Food Engineering*, 254, 1–9. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.02.021

Lv, G., Wang, F., Cai, W., & Zhang, X. (2014). Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 447, 8–13. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.01.066

Mancera-Rodríguez, J., Herrera-Hernández, M., Guzmán-Maldonado, S., & Rivera-Vázquez, R. (2019). Efecto del secado sobre compuestos fitoquímicos en la obtención de pasas de garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Avances de investigación en inocuidad de alimentos*. Accedido el 21 de noviembre del 2019 desde <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad/article/view/737/364>.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1):1-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>

Maran, J. P., Priya, B., & Nivetha, C. V. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from *Bougainvillea glabra* flowers. *Industrial Crops and Products*, 63, 182–189. doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.059

Mason, T. J., Lorimer, J. P., & Bates, D. M. (1992). Quantifying sonochemistry: Casting some light on a “black art.” *Ultrasonics*, 30(1), 40–42. doi:10.1016/0041-624x(92)90030-p

McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., & Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 370(9598), 1560–1567. doi:10.1016/s0140-6736(07)61306-3

McClements, D. (2016). *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. CRC series in contemporary food science. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.

McClements, D. & Jafari, S. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 55–79. doi:10.1016/j.cis.2017.12.001

Myers, D. (2006). *Surfactant Science and Technology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

Nikiforidis, C. V., & Kiosseoglou, V. (2011). Competitive displacement of oil body surface proteins by Tween 80 – Effect on physical stability. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1063–1068. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.10.002

Niknam, S. M., Escudero, I., & Benito, J. M. (2020). Formulation and preparation of water-In-oil-In-water emulsions loaded with a phenolic-rich Inner aqueous phase by application of high energy emulsification methods. *Foods*, 9(10), 1411. <https://doi.org/10.3390/foods9101411>



Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2003). Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2806–2812. doi:10.1021/jf020590f

O'Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*, 53, 141–154. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.02.009

Owusu, R. K., Zhu, Q., & Dickinson, E. (1992). Controlled release of L-tryptophan and Vitamin B2 from model water/oil/water multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 443–453. doi:10.1016/s0268-005x(09)80030-1

Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M., & McClements, D. (2014). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. *Journal of Food Engineering*, 142, 57–63. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.06.015

Pagano, A. P. E., Khalid, N., Kobayashi, I., Nakajima, M., Neves, M. A., & Bastos, E. L. (2018). Microencapsulation of betanin in monodisperse W/O/W emulsions. *Food Research International*, 109, 489–496. doi:10.1016/j.foodres.2018.04.053

Parra-Huertas, R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 63 (2), 5669-5684.

Piorkowski, D., & McClements, D. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5–41. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.07.009

Porrás, M., Solans, C., González, C., & Gutiérrez, J. M. (2008). Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 324(1-3), 181–188. doi:10.1016/j.colsurfa.2008.04.012

Rabelo, C., Taarji, N., Khalid, N., Kobayashi, I., Nakajima, M., & Neves, M. (2018). Formulation and characterization of water-in-oil nanoemulsions loaded with açai berry anthocyanins: Insights of degradation kinetics and stability evaluation of anthocyanins and nanoemulsions. *Food Research International*, 106, 542–548. doi:10.1016/j.foodres.2018.01.017

Ramisetty, K. A., Pandit, A. B., & Gogate, P. R. (2015). Ultrasound assisted preparation of emulsion of coconut oil in water: Understanding the effect of operating parameters and comparison of reactor designs. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 88, 70–77. doi:10.1016/j.cep.2014.12.006

Reichert, C. L., Salminen, H., Badolato Bönisch, G., Schäfer, C., & Weiss, J. (2018). Concentration effect of Quillaja saponin – Co-surfactant mixtures on emulsifying properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 519, 71–80. doi:10.1016/j.jcis.2018.01.105

Reynoso, R., Garcia, A., Morales, D., & González de Mejía, E. (1997). Stability of Betalain Pigments from a Cactacea Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2884–2889. doi:10.1021/jf960804r

Reynoso, R. C., Giner, T. V., & de Mejia, E. G. (1999). Safety of a Filtrate of Fermented Garambullo Fruit: Biotransformation and Toxicity Studies. *Food and Chemical Toxicology*, 37(8), 825–830. doi:10.1016/s0278-6915(99)00070-8

Righi Pessoa da Silva, H., da Silva, C., & Bolanho, B. C. (2018). Ultrasonic-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Food Process Engineering*, e12833. doi:10.1111/jfpe.12833

Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 391, 95–102. doi:10.1016/j.jcis.2012.08.069

Sáenz, C., Tapia, S., Chavez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.095

Salager, J. (2002). Surfactants: Types and uses. Laboratory of formulation, interfaces rheology and processes. FIRP S300A. Universidad de los Andes. Venezuela.

Sapers, G, M., & Hornstein, J. S. (1979). Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science*, 44(4), 1245–1248. doi:10.1111/j.1365-2621.1979.tb03490.x

Savolainen, K., & Kuusi, T. (1978). The stability properties of golden beet and red beet pigments: Influence of pH, temperature, and some stabilizers. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 166(1), 19–22. doi:10.1007/bf01122999

Sawicki, T., Bączek, N., & Wiczowski, W. (2016). Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods*, 27, 249–261. doi:10.1016/j.jff.2016.09.004

Shah, P. R., Gaitonde, U. N., & Ganesh, A. (2018). Influence of soy-lecithin as bio-additive with straight vegetable oil on CI engine characteristics. *Renewable Energy*, 115, 685–696. doi:10.1016/j.renene.2017.09.013

Shima, M., Kobayashi, Y., Fujii, T., Tanaka, M., Kimura, Y., Adachi, S., & Matsuno, R. (2004). Preparation of fine W/O/W emulsion through membrane filtration of coarse W/O/W emulsion and disappearance of the inclusion of outer phase solution. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 61–70. doi:10.1016/s0268-005x(03)00042-0

Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., & Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76(4), 664–669. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062



Silva, M., Anh Bui, T. H., Dharmadana, D., Zisu, B., & Chandrapala, J. (2020). Ultrasound-assisted formation of double emulsions stabilized by casein-whey protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 109, 106143. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106143

Singh, Y., Meher, J., Raval, K., Khan, F., Chaurasia, M., Jain, N., & Chourasia, M. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28–49. doi:10.1016/j.jconrel.2017.03.008.

Singleton, V, Orthofer, R., y Lamuela, R. (1999). Análisis de fenoles totales y otros sustratos de oxidación y antioxidantes por medio de reactivo folin-ciocalteu. *Methods in Enzymology*, 152-178. doi: 10.1016 / s0076-6879 (99) 99017-1

Sivagnanam Saravana, P., Shanmugapriya, K., Rudolf Nobbs Gereniu, C., Chae, S.-J., Wook Kang, H., Woo, H.-C., & Chun, B.-S. (2019). Ultrasound-mediated fucoxanthin rich oil nanoemulsions stabilized by κ -carrageenan: Process optimization, bio-accessibility and cytotoxicity. *Ultrasonics Sonochemistry*. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.03.014

Stintzing, F., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15(1), 19–38. doi:10.1016/j.tifs.2003.07.004

Stoyanova, K., Vinarov, Z., & Tcholakova, S. (2016). Improving Ibuprofen solubility by surfactant-facilitated self-assembly into mixed micelles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 36, 208–215. doi:10.1016/j.jddst.2016.10.011

Sparg, S., Light, M., & Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 219–243. doi:10.1016/j.jep.2004.05.016

Tang, S. Y., & Sivakumar, M. (2012). Design and evaluation of aspirin-loaded water-in-oil-in-water submicron multiple emulsions generated using two-stage ultrasonic cavitation emulsification technique. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7, S145–S156. doi:10.1002/apj.664



Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(3), 598–604. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.10.009

Vaillant, F., Perez, A., Davila, I., Dornier, M., & Reynes, M. (2005). Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*, 60(1), 3–12. doi:10.1051/fruits:2005007

Van Aken, G. A. (2003). Competitive adsorption of protein and surfactants in highly concentrated emulsions: effect on coalescence mechanisms. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2-3), 209–219. doi:10.1016/s0927-7757(02)00514-9

Vélez-Eraza, E., Consoli, L., & Hubinger, M. (2018). Mono and double-layer emulsions of chia oil produced with ultrasound mediation. *Food and Bioprocess Processing*. doi:10.1016/j.fbp.2018.09.007

Von Elbe, J. H., & Attoe, E. L. (1985). Oxygen involvement in betanine degradation—Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. *Food Chemistry*, 16(1), 49–67. doi:10.1016/0308-8146(85)90019-6

Woo, K., Ngou, F., Ngo, L., Soong, W., & Tang, P. (2011). Stability of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *American Journal of Food Technology*, 6(2), 140-148. doi:10.3923/ajft.2011.140.148

Wu, L., Wen, H., Chen, Y., Chung, C., Lin, Y., & Annie, J. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of red Pitaya. *Food Chemistry*, 95 (2), 319-327. doi: 10.1016 / j.foodchem.2005.01.002.

Xiong, Y., Li, Q., Miao, S., Zhang, Y., Zheng, B., & Zhang, L. (2019). Effect of ultrasound on physicochemical properties of emulsion stabilized by fish myofibrillar protein and xanthan gum. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. doi:10.1016/j.ifset.2019.04.013



Yang, Y., Leser, M., Sher, A., & McClements, D. (2013). Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 589–596. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.08.008.

Zamudio-Flores, P., Ochoa-Reyes, E., Ornelas-Paz, J., Tirado-Gallegos, J., Bello-Pérez, L., Rubio-Ríos, A., & Cárdenas-Feliz, R. (2015). Caracterización fisicoquímica, mecánica y estructural de películas de almidones oxidados de avena y plátano adicionadas con betalaínas. *Agrociencia* 49: 483-498. 2015.

Zhang, J., & Reineccius, G. A. (2015). Preparation and stability of W/O/W emulsions containing sucrose as weighting agent. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(1), 51–56. doi:10.1002/ffj.3269

Zhu, Q., Pan, Y., Jia, X., Li, J., Zhang, M., & Yin, L. (2019). Review on the Stability Mechanism and Application of Water-in-Oil Emulsions Encapsulating Various Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi:10.1111/1541-4337.12482

Zhu, Z., Wen, Y., Yi, J., Cao, Y., Liu, F., & McClements, D. (2019). Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, Quillaja saponin, and Tween 80. *Journal of Colloid and Interface Science* 536 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.024>.

IX. APÉNDICES

9.1 Curvas de calibración.

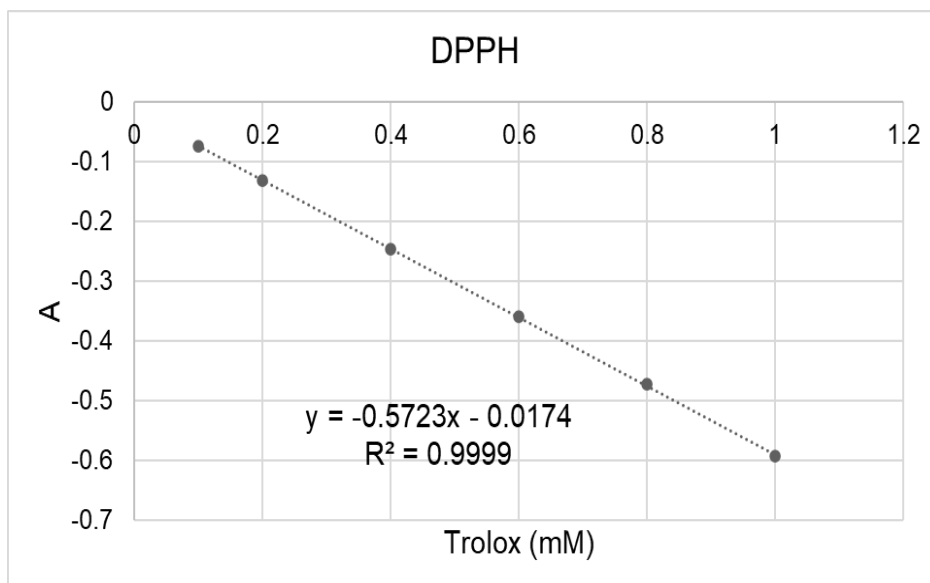


Figura 54. Curva de calibración actividad antioxidante.

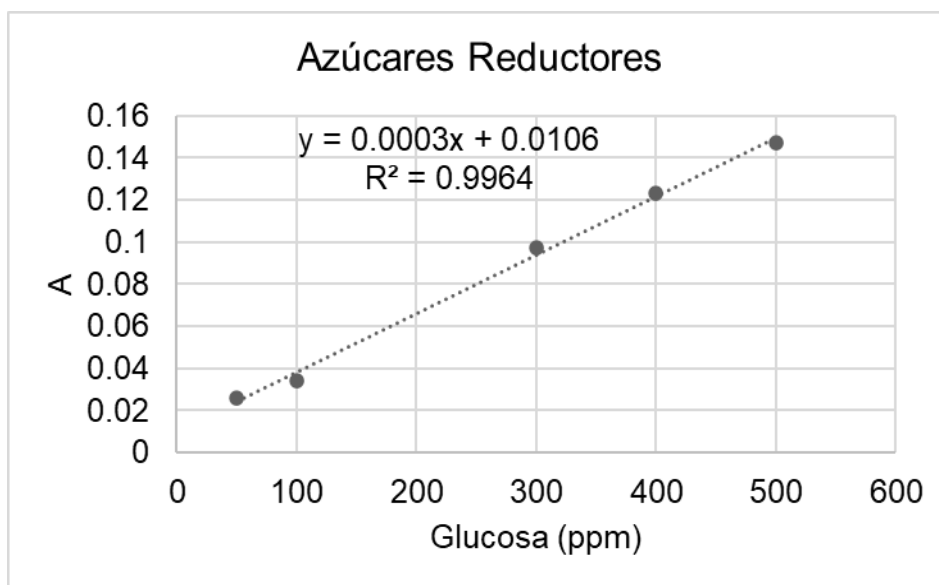


Figura 55. Curva de calibración azúcares reductores.

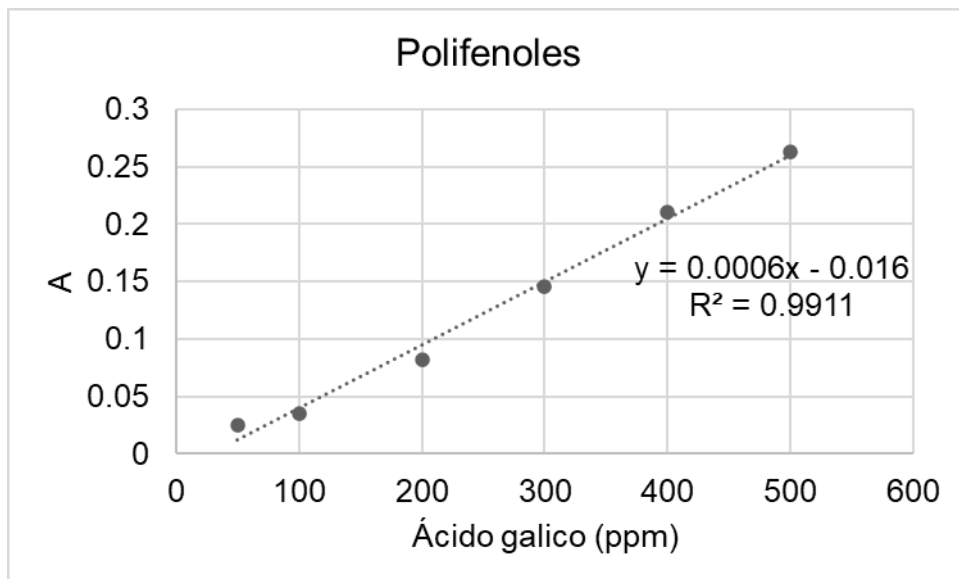


Figura 56. Curva de calibración polifenoles totales.

9.2 Análisis estadístico.

TABLA 18. Análisis de t-pareada para parámetros de color en emulsiones simples con diferentes surfactantes.

Muestra	L*-L* ₇	a*-a* ₇	b*-b* ₇
Span 80	-0.4	3.14	0.19
Tween 40	-4.11**	1.19	-14.32**
Span 80: Tween40	-12.46**	0.25	-1.54
Lecitina	0.43	2.67	-2.00
Span 80: Lecitina	19.35**	39.96**	-3.39
Tween 80	-15.9**	2.35	-5.52
Span 80: Tween 80	-5.47**	0.38	-3.88

Valor de t. ** indican efecto significativo ($p < 0.05$).

TABLA 19. Análisis de t-pareada para parámetros de color en emulsiones simples a diferentes condiciones.

Muestra	L*-L* ₇	a*-a* ₇	b*-b* ₇
30% -1 min	-5.51	2.04	-1.44
30% -3 min	-29.55**	3.17	-225.00**
50% -2 min	-3.52	6.22	-3.07
70% -1min	-3.48	0.67	-15.48**
70% -3min	-39.65**	2.65	-0.39

Valor de t. ** indican efecto significativo ($p < 0.05$).

TABLA 20. Análisis de t-pareada para diámetro de partícula en emulsiones dobles.

Emulsión	D-D ₇
D-EX	-2.89
D-C	-1.54

Valor de t. D= diámetro, D-EX= doble con extracto, D-C= doble con extracto concentrado. ** indican efecto significativo ($p < 0.05$).

TABLA 21. Análisis de t-pareada para parámetros de color en emulsiones simples y dobles con extractos de garambullo.

Muestra	L*-L* ₇	a*-a* ₇	b*-b* ₇
Extracto simple	18.03**	299.32**	-5.71**
D-EX	0.05	-1.43	-1.55
D-C	-2.06	3.20	--2.80

Valor de t. D-EX= doble con extracto, D-C= doble con extracto concentrado.

** indican diferencia significativa entre muestras ($p < 0.05$).

TABLA 22. Análisis de t-pareada en contenido de betalaínas en extractos y muestras de emulsiones dobles.

Muestra	BC	BX
	Día 0/ Día 7	Día 0/ Día 7
Extracto simple	30.38**	8.36**
D-EX	11.38**	-6.40**
D-C	5.19	152.52**

Valor de t. BC=betacianinas, BX= betaxantinas. D-EX= doble con extracto, D-C= doble con extracto concentrado. ** Indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante prueba de t-pareada entre el día 0 y día 7.

TABLA 23. Análisis de t-pareada en actividad antioxidante y contenido de polifenoles en emulsiones dobles con extracto de garambullo.

Muestra	AA. Día 0/Día 7	PT. Día 0/Día 7
Extracto	49.47**	3.38
D-EX	-47.04**	17.24**
D-C	3.38	16.26**

Valor de t. AA: actividad antioxidante, PT: Polifenoles totales, D-EX= doble con extracto, D-C= doble con extracto concentrado. ** indican diferencia significativa entre muestras ($p < 0.05$).

TABLA 24. Análisis de t-pareada para evaluación de emulsiones con betacianinas y betaxantinas.

Parámetro	Emulsión betacianina (Día 0/Día 7)	Emulsión betaxantina (Día 0/Día 7)
Betacianina*	17.42**	4.88**
Betaxantina*	5.52**	3.50**
L*	-4.99**	-2.32
a*	-15.16**	1.23
b*	-33.67**	-18.86**

Valor de t. BC = Equivalentes Betacianinas, BX = Equivalentes de Betaxantinas.

** indican diferencia significativa entre muestras del día 0 y día 7 ($p < 0.05$).