



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



“Evaluación de pectinas cítricas de toronja (*Citrus paradisi* var. Star Ruby) y mandarina (*Citrus reticulata* blanco var. Tangerina) como agentes encapsulantes de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* Bertoni”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica

PRESENTA:

BQ. José Isabel Martínez Castillo

TUTOR:

Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera

COTUTOR:

Dra. Neith Aracely Pacheco López

ASESORES:

Dr. Erik Manuel de Atocha Polanco Lugo

Dra. Tania González Flores

Dra. Miriam Fabiola Fabela Morón

Dr. Ariel Vázquez Elorza

Mérida, Yucatán, a 11 de diciembre del 2018

Mérida, Yucatán a 15 de noviembre de 2018

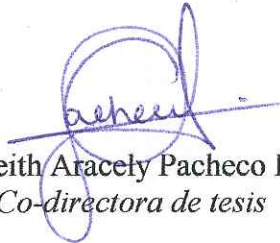
CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **José Isabel Martínez Castillo**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“EVALUACIÓN DE PECTINAS CÍTRICAS DE TORONJA (*Citrus paradisi* var. Star Ruby) Y MANDARINA (*Citrus reticulata* blanco var. Tangerina) COMO AGENTES ENCAPSULANTES DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *Stevia rebaudiana* BERTONI”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 15 del mes de noviembre del año dos mil dieciocho.



Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera
Directora de tesis



Dra. Neith Aracely Pacheco López
Co-directora de tesis



Dr. Erik Manuel de Atocha Polanco Lugo
Asesor



Dra. Tania González Flores
Asesora



Dra. Miriam Fabiola Fabela Morón
Asesora



Dr. Ariel Vázquez Elorza
Asesor



FOR-DI-08-43 r.0

Mérida, Yucatán a 05 de diciembre de 2018

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL
ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del sínodo evaluador del estudiante **José Isabel Martínez Castillo**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“EVALUACIÓN DE PECTINAS CÍTRICAS DE TORONJA (*Citrus paradisi* var. Star Ruby) Y MANDARINA (*Citrus reticulata* blanco var Tangerina) COMO AGENTES ENCAPSULANTES DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *Stevia rebaudiana* BERTONI”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 05 del mes de diciembre del año dos mil dieciocho.

Dr. Norberto Ulises García Cruz
Presidente

Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino
Secretario

Dr. Manuel Octavio Ramírez Sucre
Vocal

TÍTULO:

“Evaluación de pectinas cítricas de toronja (*Citrus paradisi* var. Star Ruby) y mandarina (*Citrus reticulata* blanco var. Tangerina) como agentes encapsulantes de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* Bertoni”

PRESENTA: BQ. José Isabel Martínez Castillo

JUNTA DIRECTIVA:

DIRECTORA: Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera

CO-DIRECTORA: Dra. Neith Aracely Pacheco López

ASESOR: Dr. Erik Manuel de Atocha Polanco Lugo

ASESORA: Dra. Tania González Flores

ASESORA: Dra. Miriam Fabiola Fabela Morón

ASESOR: Dr. Ariel Vázquez Elorza

Mérida, Yucatán.

Diciembre, 2018

DEDICATORIA

A mis padres, María de Lourdes y Esteban, que siempre me han apoyado, incluso cuando decidí iniciar este proyecto.

A mis hermanas, Verónica y Ana Karen, porque a pesar de no estar a su lado durante el posgrado siempre estuvieron conmigo.

A mi abuelita, porque siempre me apoyo y estuvo al pendiente de mí.

A mi familia en general, por todos los ánimos brindados.

Con cariño, José

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias por todo, porque nunca me desamparo en este camino y porque jamás habría podido culminar este proyecto sin él. *“dad gracias en todo, porque esta es la voluntad de Dios para vosotros en Cristo Jesús”* 1 Tesalonicenses 5:18.

Al CONACYT, por el sustento otorgado para la realización del proyecto a través de la beca de estudios de posgrado con número (CVU/Becario) 790083/613017.

A la Dra. Teresa Ayora, mi directora de tesis, quien me brindó su apoyo, comprensión, tiempo, mucha paciencia y su confianza para la realización de este proyecto.

A mi comité total, integrado por el Dr. Erik Polanco, la Dra. Neith Pacheco, la Dra. Tania González, la Dra. Miriam Fabela y el Dr. Ariel Vázquez, por todas sus aportaciones y recomendaciones que fueron enriqueciendo este proyecto.

A todos mis compañeros, especialmente a Betsy, Nelly, Emanuel y Yoselin, porque a pesar de todos los altibajos, siempre me apoyaron dentro y fuera del laboratorio, motivándome a seguir adelante.

A todos mis “roomies”, especialmente a Víctor, Alex, Jazz, Joaquín, Ray e Iván, porque además de ser mi segunda familia siempre estuvieron recordándome mis deberes con la tesis.

A Ilse, porque a pesar de la distancia estuvo conmigo brindándome su paciencia durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Erik Polanco Lugo, porque desde el inicio me apoyo y guió con base en su experiencia para que yo pudiera cumplir con los objetivos del proyecto.

Al Dr. Ariel Vázquez Elorza, Catedrático-CONACYT, porque fue una de las personas que me impulsaron a iniciar este proyecto, y siempre estuvo animándome a seguir adelante.

Al Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino, Catedrático-CONACYT, quien me asesoró y apoyo de manera práctica en el laboratorio para la realización de la parte reológica de esta investigación.

Al Dr. Manuel Octavio Ramírez Sucre, porque gracias a sus esfuerzos se obtuvo parte del material, equipo y recurso necesario para poder realizar esta tesis.

A la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda, que en colaboración con el CICY brindó su apoyo para la realización de actividades experimentales.

Al Dr. Hugo Espinosa Andrews, que en colaboración con el CIATEJ-Unidad Zapopan brindó su apoyo para la realización de actividades experimentales.

A la Unidad Sureste del CIATEJ, por su amplia disposición para el uso de las instalaciones y de equipos necesarios para la realización de este proyecto de investigación.

A todos ustedes, ¡MUCHAS GRACIAS!

Tabla de Contenido

| | |
|--|----|
| Lista de Tablas..... | i |
| Lista de Figuras | ii |
| Abreviaturas y símbolos | iv |
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 3 |
| 3. Antecedentes | 5 |
| 3.1 Encapsulación | 5 |
| 3.1.1 Aplicaciones..... | 5 |
| 3.1.2 Tipos de microencapsulación..... | 6 |
| 3.1.2.1 Procesos químicos | 6 |
| 3.1.2.1.1 Coacervación | 6 |
| 3.1.2.1.2 Co-cristalización | 7 |
| 3.1.2.1.3 Polimerización interfacial | 8 |
| 3.1.2.1.4 Gelificación iónica | 8 |
| 3.1.2.1.5 Incompatibilidad polimérica | 9 |
| 3.1.2.1.6 Atrapamiento en liposomas | 9 |
| 3.1.2.1.7 Inclusión molecular..... | 10 |
| 3.1.2.2 Procesos mecánicos | 10 |
| 3.1.2.2.1 Extrusión..... | 10 |
| 3.1.2.2.2 Secado por congelamiento/enfriamiento | 11 |
| 3.1.2.2.3 Liofilización | 11 |
| 3.1.2.2.4 Secado por aspersión..... | 11 |
| 3.1.2.2.4.1 Materiales de pared para el secado por aspersión | 13 |
| 3.1.2.2.4.1.1 Carbohidratos | 13 |

| | |
|---|----|
| 3.1.2.2.4.1.2 Proteínas | 15 |
| 3.1.2.2.4.1.3 Gomas..... | 15 |
| 3.2 Pectina..... | 15 |
| 3.2.1 Propiedades bio-funcionales | 17 |
| 3.2.2 Propiedades tecno-funcionales..... | 18 |
| 3.2.3 Fuentes de pectina | 19 |
| 3.2.3.1 Fuentes convencionales | 19 |
| 3.2.3.2 Otras fuentes de pectina..... | 19 |
| 3.2.4 Extracción de pectina | 20 |
| 3.2.4.1 Extracción convencional (EC)..... | 20 |
| 3.2.4.2 Métodos de extracción alternativos | 20 |
| 3.2.4.2.1 Extracción con calentamiento por inducción electromagnética (ECIE)..... | 21 |
| 3.2.4.2.2 Extracción asistida por enzimas (EAE) | 22 |
| 3.2.4.2.3 Extracción asistida por microondas (EAM)..... | 22 |
| 3.2.4.2.4 Extracción por fluidos supercríticos (EFS)..... | 23 |
| 3.2.4.2.5 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)..... | 24 |
| 3.2.5 Usos y aplicaciones | 25 |
| 3.2.5.1 La pectina como agente encapsulante | 28 |
| 3.3 Polifenoles | 29 |
| 3.3.1 Potencial biológico de los polifenoles..... | 29 |
| 3.3.2 Estabilidad y biodisponibilidad..... | 29 |
| 3.3.3 Métodos de protección | 30 |
| 3.3.3.1 Encapsulación de polifenoles por secado por aspersión..... | 31 |
| 3.4 Estevia..... | 32 |
| 3.4.1 Esteviósidos..... | 32 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4.2 | Compuestos fenólicos | 34 |
| 3.4.3 | Extracción de compuestos bioactivos de la estevia..... | 35 |
| 3.4.3.1 | Extracción convencional..... | 35 |
| 3.4.4 | Usos y aplicaciones de la estevia. | 37 |
| 4. | Justificación..... | 38 |
| 5. | Hipótesis..... | 40 |
| 6. | Objetivos | 41 |
| 6.1 | General..... | 41 |
| 6.2 | Específicos | 41 |
| 7. | Metodología | 42 |
| 7.1 | Materias primas..... | 42 |
| 7.1.1 | Harinas cítricas..... | 42 |
| 7.1.2 | Harina de estevia | 43 |
| 7.2 | Caracterización de materias primas | 43 |
| 7.2.1 | Determinación del contenido de humedad..... | 43 |
| 7.2.2 | Determinación de cenizas..... | 44 |
| 7.2.3 | Determinación de grasas | 44 |
| 7.2.4 | Determinación de proteínas..... | 44 |
| 7.2.5 | Determinación de fibra cruda..... | 45 |
| 7.2.6 | Determinación de Extracto Libre de Nitrógeno ELN (carbohidratos totales) | 45 |
| 7.2.7 | Determinación de acidez titulable | 45 |
| 7.2.8 | Determinación de pH | 46 |
| 7.2.9 | Determinación de actividad de agua | 46 |
| 7.2.10 | Determinación del color | 46 |
| 7.3 | Extracción de pectinas | 46 |

| | |
|---|----|
| 7.3.1 Extracción convencional (EC) | 46 |
| 7.3.2 Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) | 47 |
| 7.3.3 Recuperación de la pectina..... | 47 |
| 7.3.4 Rendimiento de extracción (%Rend) | 48 |
| 7.3.5 Rendimiento total de extracción (%T-Rend): Segunda extracción | 48 |
| 7.4 Caracterización de pectinas..... | 48 |
| 7.4.1 Análisis fisicoquímicos | 49 |
| 7.4.1.1 Azúcares totales..... | 50 |
| 7.4.1.2 Determinación de acidez libre | 50 |
| 7.4.2 Análisis de propiedades estructurales | 50 |
| 7.4.2.1 Grado de esterificación (%GE)..... | 50 |
| 7.4.2.2 Ácido galacturónico (%AcGal) | 51 |
| 7.4.2.3 Viscosidad intrínseca $[\eta]$ y estimación del peso molecular viscosimétrico (PMol) | 51 |
| 7.4.2.4 Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier..... | 52 |
| 7.4.3 Análisis de propiedades funcionales | 52 |
| 7.4.3.1 Contenido de polifenoles totales (CPT) | 52 |
| 7.4.3.2 Capacidad de retención de agua (CRAg) | 53 |
| 7.4.3.3 Capacidad de retención de aceite (CRAc)..... | 53 |
| 7.4.3.4 Propiedades emulsificantes | 54 |
| 7.4.3.5 Propiedades espumantes | 54 |
| 7.4.3.6 Solubilidad..... | 55 |
| 7.4.4 Análisis reológico..... | 55 |
| 7.4.4.1 Curvas de flujo de soluciones de pectina | 55 |
| 7.4.4.2 Curvas de frecuencia de soluciones de pectina | 55 |

| | |
|--|----|
| 7.5 Extracción de compuestos bioactivos de estevia..... | 56 |
| 7.5.1 Separación cromatográfica del extracto de estevia | 56 |
| 7.5.1.1 Primer método | 56 |
| 7.5.1.2 Segundo método | 56 |
| 7.6 Caracterización del extracto de estevia..... | 57 |
| 7.6.1 Determinación del Contenido de Polifenoles Totales (CPT)..... | 57 |
| 7.6.1.1 Método espectrofotométrico..... | 57 |
| 7.6.1.2 Método cromatográfico | 57 |
| 7.6.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los polifenoles..... | 58 |
| 7.6.2.1 Método por ABTS | 58 |
| 7.6.2.2 Método por DPPH | 59 |
| 7.6.2.3 Método FRAP | 59 |
| 7.7 Encapsulación del extracto acuoso de estevia | 60 |
| 7.7.1 Preparación de agentes encapsulantes..... | 60 |
| 7.7.1.1 Pectina cítrica (PC)..... | 60 |
| 7.7.1.2 Proteína de chícharo (PCh)..... | 60 |
| 7.7.1.3 Goma arábiga seyal (GA) | 60 |
| 7.7.2 Formación encapsulados en suspensión..... | 61 |
| 7.8 Proceso de secado por aspersión..... | 62 |
| 7.8.1 Evaluación de las microcápsulas..... | 62 |
| 7.8.1.1 Rendimiento de encapsulación (% R-cap)..... | 63 |
| 7.8.1.2 Eficiencia de encapsulación (%Ef-cap)..... | 63 |
| 7.8.1.3 Eficiencia de liberación (%Ef-lib)..... | 64 |
| 7.8.1.4 Resistencia y estabilidad de los encapsulados al calor | 64 |
| 7.8.2 Caracterización fisicoquímica y morfológica de los encapsulados..... | 65 |

| | |
|---|----|
| 7.8.2.1. Análisis fisicoquímicos | 65 |
| 7.8.2.2 Solubilidad..... | 65 |
| 7.8.2.3 Higroscopicidad..... | 65 |
| 7.8.2.4 Humectabilidad..... | 65 |
| 7.8.2.5 Tamaño de partícula | 65 |
| 7.9 Análisis estadístico | 65 |
| 8. Resultados y discusión | 67 |
| 8.1 Caracterización de materia prima | 67 |
| 8.1.1 Caracterización fisicoquímica de harinas cítricas | 67 |
| 8.1.2 Caracterización de harinas de estevia..... | 70 |
| 8.2 Rendimientos de la extracción de pectina..... | 70 |
| 8.2.1 Método convencional | 70 |
| 8.2.2 Método asistido por ultrasonido..... | 71 |
| 8.2.3 Segunda extracción | 74 |
| 8.2.4 Cantidad total de pectina (%Pect-T) | 76 |
| 8.3 Caracterización de pectinas..... | 77 |
| 8.3.1 Caracterización fisicoquímica | 77 |
| 8.3.2 Caracterización estructural..... | 80 |
| 8.3.3 Caracterización funcional..... | 84 |
| 8.3.4 Características reológicas..... | 89 |
| 8.3.4.1 Curvas de flujo | 89 |
| 8.3.4.2 Curvas de frecuencia | 91 |
| 8.4 Caracterización del extracto acuoso de estevia..... | 91 |
| 8.4.1 Cuantificación e identificación del contenido de polifenoles totales..... | 91 |
| 8.4.2 Determinación de la actividad antioxidante | 96 |

| | |
|---|-----|
| 8.4.3 Caracterización de las fracciones del extracto | 97 |
| 8.4.3.1 Método 1 | 97 |
| 8.4.3.2 Método 2..... | 99 |
| 8.5 Encapsulación del extracto acuoso de estevia | 100 |
| 8.5.1 Eficiencia de encapsulación (%Ef-cap)..... | 102 |
| 8.5.2 Eficiencia de liberación (%Ef-lib)..... | 104 |
| 8.5.2.1 Método de liberación de polifenoles | 104 |
| 8.5.2.2 Liberación de polifenoles de la matriz polimérica | 105 |
| 8.5.3 Resistencia al calor..... | 106 |
| 8.5.4 Caracterización fisicoquímica de los encapsulados | 107 |
| 8.5.4.1 Tamaño de partícula | 109 |
| 9. Conclusiones | 111 |
| 10. Perspectivas y recomendaciones | 112 |
| 11. Referencias bibliográficas | 113 |
| 12. Anexos | 135 |
| ANEXO 1. Tablas de análisis de varianza del diseño factorial para la extracción de pectina de harinas cítricas | 135 |
| ANEXO 2. Protocolo de lavado y desinfección del material | 137 |
| ANEXO 3. Curvas de calibración..... | 138 |
| ANEXO 4. Tablas de análisis de varianza del diseño factorial utilizado para determinar el %Ef-cap de las pectinas cítricas..... | 141 |
| ANEXO 5. Graficas de distribución de tamaño de partícula de los polvos..... | 142 |
| ANEXO 6. Productividad | 144 |

Lista de Tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Funciones de materiales de pared..... | 14 |
| Tabla 2. Pectinas obtenidas a partir de Extracción Asistida por Ultrasonido..... | 26 |
| Tabla 3. Aplicaciones de la pectina..... | 27 |
| Tabla 4. Ejemplos de sistemas de encapsulación de polifenoles..... | 31 |
| Tabla 5. Composición de glucósidos de esteviol en hojas de estevia deshidratada | 33 |
| Tabla 6. Composición de compuestos fenólicos en estevia..... | 34 |
| Tabla 7. Métodos de extracción de compuestos bioactivos de estevia..... | 36 |
| Tabla 8. Diseño factorial del proceso de encapsulación..... | 63 |
| Tabla 9. Caracterización fisicoquímica a harinas cítricas | 67 |
| Tabla 10. Rendimientos de extracción de pectina por el método convencional..... | 71 |
| Tabla 11. Matriz de diseño factorial para la extracción de pectina de toronja..... | 72 |
| Tabla 12. Matriz de diseño factorial para la extracción de pectina de mandarina | 74 |
| Tabla 13. Cantidad total de pectina en harinas cítricas. | 76 |
| Tabla 14. Caracterización fisicoquímica a pectinas cítricas..... | 79 |
| Tabla 15. Caracterización estructural a las pectinas extraídas. | 81 |
| Tabla 16. Caracterización funcional de las pectinas..... | 84 |
| Tabla 17. Solubilidad de pectinas cítricas | 88 |
| Tabla 18. Parametros de modelo para las curvas de flujo | 90 |
| Tabla 19. Identificación y cuantificación de CPT en el extracto de estevia..... | 93 |
| Tabla 20. Actividad antioxidante del extracto de estevia | 96 |
| Tabla 21. Actividad antioxidante de fracciones cromatográficas..... | 98 |
| Tabla 22. Compuestos fenólicos identificados en fracciones del extracto de estevia. | 100 |
| Tabla 23. Rendimientos de microencapsulación del extracto de estevia | 101 |
| Tabla 24. Resistencia de la matriz a altas temperaturas | 107 |
| Tabla 25. Propiedades reconstitutivas de los polvos | 108 |
| Tabla 26. Fotografías ópticas de los polvos. | 110 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de las diferentes técnicas de microencapsulación | 7 |
| Figura 2. Esquema de un <i>secador por aspersión</i> | 12 |
| Figura 3. Estructura molecular de la pectina, a) Estructura general y b) Cadena principal. | 17 |
| Figura 4. Fuentes de pectina. | 19 |
| Figura 5. Métodos de extracción de pectina. | 21 |
| Figura 6. Funcionalidad de polifenoles en el organismo. | 30 |
| Figura 7. Principales glucósidos de estevia, A) esteviósido y B) rebaudiósido A. | 34 |
| Figura 8. Presentaciones de uso de la estevia. | 35 |
| Figura 9. Proceso de obtención de harinas cítricas. Fuente: Elaboración propia con imágenes de Gonzalez-Flores (2016). | 42 |
| Figura 10. Proceso de obtención de harinas de estevia. Fuente: Elaboración propia. | 43 |
| Figura 11. Esquema de extracción de pectina % T-Rend. | 49 |
| Figura 12. Proceso de formación de suspensiones | 61 |
| Figura 13. Diagramas de pareto de los efectos significativos en el rendimiento de extracción de pectina de harinas cítricas: A) toronja, B) mandarina | 72 |
| Figura 14. Graficas de interacción de los factores evaluados en el rendimientos de extracción de pectina de harinas cítricas: A) toronja, B) mandarina | 73 |
| Figura 15. Rendimientos totales de pectinas cítricas. | 75 |
| Figura 16. Pectinas cítricas extraídas. | 80 |
| Figura 17. Espectros FTIR de pectinas cítricas. | 83 |
| Figura 18. Propiedades funcionales de las pectinas cítricas: Estabilidad espumante (A) y Estabilidad emulsificante (B) | 87 |
| Figura 19. Curvas de flujo de soluciones de pectina: A) Soluciones 1% B) Soluciones 2%. | 89 |
| Figura 20. Curvas de frecuencia de soluciones de pectina. | 92 |
| Figura 21. Cromatograma del perf il polifenólico del extracto de estevia | 94 |
| Figura 22. Polifenoles indentificados en el EAS: A) ácido clorogénico, B) diosmina. | 95 |
| Figura 23. Cromatogr ama de fracciones recuperadas del extracto de estevia: Metodo 1. | 97 |
| Figura 24. Cromatogr ama de fracciones recuperadas del extracto de estevia: Metodo 2. | 99 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25. Efecto del tipo de pectina y método de extracción en la encapsulación de extractos acuosos de estevia: A) Diagrama de Pareto de factores significativos, B) Gráfico de interacciones de los factores evaluados..... | 102 |
| Figura 26. Resultados de la Ef-lib con diferentes métodos | 104 |
| Figura 27. Formación de la matriz polimérica | 106 |

Abreviaturas y símbolos

| Símbolo | Definición |
|----------------------|--|
| % | Porcentaje |
| % R-cap | Rendimiento de encapsulación |
| %Ef-cap | Eficiencia de encapsulación |
| %Ef-lib | Eficiencia liberación |
| %Pec-T | Cantidad total de pectina |
| %Rend | Rendimiento de extracción de pectina |
| %T-Rend | Rendimiento total de extracción de pectina |
| °C | Grado Celsius |
| µg | Microgramos |
| µL | Micro litros |
| µm | Micras |
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) |
| AcGal | Ácido galacturónico |
| ATR | Reflectancia Total Atenuada |
| Aw | Actividad de agua |
| bs | Base seca |
| Ca ⁺² | Ion calcio |
| CEm | Capacidad emulsificante |
| CEs | Capacidad espumante |
| CH ₃ COOH | Ácido acético |
| cm | Centímetro |
| Co ⁺² | Ion cobalto |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CPT | Contenido de polifenoles totales |
| CRAc | Capacidad de retención de aceite |
| CRAg | Capacidad de retención de agua |
| CuSO ₄ | Sulfato de cobre |
| dL | Decilitros |

| | |
|--------------------------------------|---|
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl |
| EAE | Extracción asistida por enzimas |
| EAM | Extracción asistida por microondas |
| EAS | Extracto acuosos de estevia |
| EAU | Extracción asistida por ultrasonido |
| EC | Extracción convencional |
| ECIE | Extracción con calentamiento por inducción electromagnética |
| EEm | Estabilidad emulsificante |
| EES | Estabilidad espumante |
| EFS | Extracción por fluidos supercríticos |
| ELN | Extracto libre de nitrógeno |
| ESEAU | Extracto de estevia por extracción asistida por ultrasonido |
| EtOH | Etanol |
| Fe ⁺² | Ion fierro |
| FeCl ₃ *6H ₂ O | Cloruro de fierro III hexa-hidratado |
| FRAP | Poder antioxidante de la reducción férrica |
| FTIR | Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier |
| g | Gramos |
| GA | Goma arábica |
| GE | grado de metil-esterificación |
| GM | Grado de metoxilación |
| h | Hora |
| H ₂ Od | Agua destilada |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| H ₃ BO ₃ | Ácido bórico |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| HCOOH | Ácido fórmico |
| HG | Homogalacturonano |
| hrs | Horas |
| Hz | Hertz |
| K ⁺ | Ion potasio |

| | |
|---------------------------|--------------------------------|
| $K_2S_2O_8$ | Persulfato de potasio |
| K_2SO_4 | Sulfato de potasio |
| Kcal | Kilo calorías |
| KCl | Cloruro de potasio |
| Kg | Kilogramos |
| KH_2PO_4 | Fosfato monopotásico |
| kHz | Kilo Hertz |
| L | Litros |
| m | Metros |
| M | Molar |
| m^3 | Metro cubico |
| MeCN | Acetonitrilo |
| mEq | Mili equivalentes |
| mg | Miligramos |
| Mg^{+2} | Ion magnesio |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| mM | Mili molar |
| N | Normal |
| Na^+ | Ion sodio |
| Na_2HPO_4 | Fosfato de disódio |
| $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ | Acetato de sodio tri-hidratado |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| ND | No determinado |
| NI | No identificado |
| nm | Nanómetros |
| O_2 | Oxígeno |
| p/v | Relación peso-volumen |
| P^{-3} | Ion fosforo |
| Pas | Pascales |

| | |
|------------------|---|
| PBS | Buffer fosfato-salino |
| PC | Pectina comercial |
| PCh | Proteína de chícharo |
| PMC | Pectina mandarina método convencional |
| PMU | Pectina mandarina método ultrasonido |
| Polif | Polifenoles |
| ppm | Partes por millón |
| PTC | Pectina toronja método convencional |
| PTU | Pectina toronja método ultrasonido |
| RG-I | ramnogalacturonano I |
| RG-II | ramnogalacturonano II |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| Tg | Temperatura de transición vítrea |
| TPTZ | 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine |
| UPLC | Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia |
| UV | Ultravioleta |
| v/v | Relación volumen-volumen |
| VC | Volumen de columna |
| W | Watts |
| Zn ⁺ | Ion zinc |
| α | Enlace alfa |
| η | Viscosidad intrínseca |
| η _{red} | Viscosidad reducida |
| η _{rel} | Viscosidad relativa |
| η _{sp} | Viscosidad específica |
| λ | Longitud de onda |

1. Resumen

En los últimos años el consumo polifenoles ha cobrado gran importancia debido a los diversos beneficios que proporcionan a la salud, principalmente como antioxidantes. La estevia además de proporcionarnos los esteviósidos como edulcorantes, también tiene polifenoles. Estos últimos, durante su absorción pueden interactuar con diferentes moléculas e incluso la fibra dietética disminuyendo su biodisponibilidad. Una alternativa para favorecer esta biodisponibilidad es protegiéndolos con la encapsulación utilizando cubiertas de origen vegetal como las pectinas.

En este trabajo, se presenta el uso de pectinas cítricas como material de cubierta para encapsular extractos acuosos de estevia, evaluando el efecto que tiene este tipo de biopolímero en la estabilidad de los polifenoles. La parte experimental se dividió en cuatro etapas.

Inicialmente se obtuvieron las pectinas cítricas a partir de residuos de toronja y mandarina, empleando EC y EAU. Los resultados mostraron que las propiedades y estructura de la pectina se modifican por el efecto del método de extracción, ya que la viscosidad, el PMol, GE y AcGal disminuyeron significativamente en las pectinas obtenidas por EAU, sin embargo, este método permite extraer una mayor cantidad de pectina (PT=5.81% y PM=33.79%) más con respecto a al EC).

En la segunda etapa, se obtuvo el extracto acuoso de estevia, en el cual se identificó a la diosmina (60.25 mg/g) y el ácido clorogénico (22.21 mg/g), siendo a este último el responsable de gran parte del efecto antioxidante del extracto de estevia. El %AA del extracto de estevia presentó mayor porcentaje de inhibición (75% al radical DPPH y 91.78% al radical ABTS) que los estándares de diosmina, ácido clorogénico y el antioxidante sintético BHT.

La etapa tres consistió en la encapsulación de los polifenoles del extracto de estevia utilizando proteína de chícharo, goma arábiga y las pectinas cítricas. Se observó que una elevada concentración del extracto de estevia dificultó la formación de la suspensión, ya que se forman complejos insolubles con la proteína por la presencia de iones divalentes como el calcio, mientras que con la pectina se forma un gel débil dificultando su manipulación. Las concentraciones utilizadas para el proceso de encapsulación fueron 0.5% de proteína de

chícharo, 500 mg de polifenoles totales de estevia, 0.2% de pectina cítrica y 10% de goma arábica.

Finalmente, en la última etapa se evaluó la estabilidad de los polifenoles en dicha matriz, y se realizó una caracterización fisicoquímica de las microcápsulas obtenidas. La eficiencia de encapsulación fue >90% en todos los tratamientos que contenían pectinas cítricas, lo que demuestra efectividad de esta molécula para estabilizar el sistema de encapsulación. Las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas pueden permitir que estos polvos sean reconstituidos en un nuevo sistema e incluso adicionados a procesos de elaboración de alimentos.

2. Introducción

El análisis y estudio de biomoléculas de grado alimentario representa una tendencia en la investigación y desarrollo de nuevos avances tecnológicos para la industria; un ejemplo de este tipo de biomoléculas es la pectina, la cual ha cobrado relevancia por las propiedades tecno funcionales que confiere a algunos alimentos.

Este biopolímero se encuentra en la pared de las células vegetales, principalmente de cítricos, de donde puede extraerse utilizando procedimientos alternativos a los convencionales con el fin de obtener mayores eficiencias de extracción. Uno de estos métodos alternativos es la Extracción Asistida por Ultrasonido, que ha sido ampliamente descrito como un método verde para la extracción de pectina.

Hoy en día se han reportado nuevas aplicaciones para la pectina, entre las más relevantes destacan la formación y estabilización de sistemas alimentarios complejos, esto con el fin de incorporar compuestos bioactivos en matrices poliméricas biodegradables para su protección y futuros usos.

En este sentido, existen algunos compuestos bioactivos que son altamente inestables cuando son extraídos de su fuente vegetal, y que pueden degradarse durante su procesamiento, almacenamiento, e incluso cuando son ingeridos. Dentro de estos compuestos encontramos a los polifenoles, metabolitos secundarios de las plantas que al ser ingeridos proporcionan efectos positivos a la salud por su actividad antimicrobiana y, principalmente, la antioxidante.

Una planta que posee esta clase de compuestos es la estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), que es conocida por tener un poder edulcorante 300 veces más potente que la sacarosa; pero la importancia de la utilización de esta planta en la investigación está asociado a los compuestos antioxidantes, específicamente a los polifenoles.

Por tal motivo, se han comenzado a buscar alternativas innovadoras para consumir la estevia aprovechando sus compuestos bioactivos, una de estas propuestas se basa en la protección de estos compuestos mediante la encapsulación, utilizando agentes poliméricos adecuados que permitan la protección de los polifenoles mediante la formación de matrices de grado alimentario.

Por lo anterior, en este trabajo se evalúa la utilización de las pectinas obtenidas de los residuos agroindustriales de toronja y mandarina, en combinación con otros biopolímeros, para la construcción de matrices poliméricas estables que permitan la encapsulación de diferentes compuestos bioactivos obtenidos de hojas de estevia.

3. Antecedentes

3.1 Encapsulación

La encapsulación es un proceso fisicoquímico o mecánico para atrapar una sustancia (agente activo) en un material polimérico con el fin de producir partículas con diámetros de unos pocos nanómetros (nanoencapsulación), micrómetros (microencapsulación) o escala milimétrica (macroencapsulación) (Zanetti et al., 2018).

Una de las formas de encapsulación más común es mediante la obtención de partículas de tamaño micrométrico, es decir, la microencapsulación. Este proceso favorece el manejo de los compuestos encapsulados, ya que pueden incorporarse en un vehículo adecuado que permita una liberación controlada y dirigida, mejorando la seguridad y eficacia ya que incrementa la protección del compuesto bioactivo (Burgain et al., 2011).

En la industria de alimentos, la microencapsulación es una solución tecnológica para optimizar la preservación de compuestos activos de las materias primas en los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento (Ye et al., 2018); durante este proceso, el compuesto activo es rodeado por una cubierta de algún material protector para producir cápsulas en el rango de micras a milímetros, que son conocidas como microcápsulas (López, 2010).

3.1.1 Aplicaciones

Los primeros procesos en donde se utilizó la técnica de microencapsulación se desarrollaron en los años 1930 y 1940 por la *National Cash Register* para la aplicación comercial de un tinte empleando gelatina como agente encapsulante. Las aplicaciones de la microencapsulación son:

Industria alimentaria: Se utiliza con el objetivo de elaborar productos funcionales y nutraceuticos (Sanguansri & Augustin, 2010).

- Agricultura: Es esta área se ha utilizado la microencapsulación para elaborar algunos insecticidas, fungicidas y en los fertilizantes de cesión lenta (Lozano, 2009).
- Cosmética y perfumería: Se usan microcápsulas que contienen sustancias olorosas que son liberadas en el perfume al frotar suavemente tras su aplicación (Fuchs et al., 2006).
- Farmacia: Con ello se consigue una liberación sostenida o controlada del principio activo a partir de la forma farmacéutica (López, 2010).

En la industria alimentaria, las aplicaciones de la microencapsulación se ha venido utilizando por más de 60 años (López, 2010); por lo que existe un gran número de trabajos de investigación que se centran en el estudio de la encapsulación de compuestos activos, ya que con este proceso se puede controlar la reacción oxidativa, enmascarar sabores, colores y olores, proporcionar una liberación sostenida y controlada, ampliar la vida útil, etc. (Burgain et al., 2011).

3.1.2 Tipos de microencapsulación

Existen diversas técnicas que pueden emplearse para desarrollar el proceso de microencapsulación. La selección de la técnica adecuada se ve determinada por las propiedades físico-químicas y/o funcionales del material encapsulante y la aplicación final deseada, con el objeto de asegurar la biodisponibilidad del compuesto activo, su funcionalidad e incluso su fácil incorporación en los alimentos sin la alteración de sus propiedades sensoriales (Pasin et al., 2012). Las técnicas comunes que se han usado ampliamente para los procesos de microencapsulación en la industria alimentaria son métodos mecánicos, es decir, secado por pulverización y recubrimiento en lecho fluidizado, y métodos químicos, es decir, polimerización interfacial y coacervación (Figura 1).

3.1.2.1 Procesos químicos

3.1.2.1.1 Coacervación

Esta técnica es considerada el método original de microencapsulación (Parras, 2011). Se presenta en soluciones coloidales y consiste en la separación de partículas coloides, que luego se aglomeran en una fase líquida separada llamada coacervado (Madene, Jacquot, Scher, & Desobry, 2006). En general el proceso de coacervación consiste de tres pasos (Islas, 2002):

1. Formación de un sistema de tres fases químicamente inmiscibles: una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared.
2. Deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta sobre el material a cubrir: el polímero se deposita en forma de pequeñas gotas líquidas (coacervado) alrededor de las partículas insolubles dispersas en el líquido.
3. Solidificación de la cubierta: por una gelificación se forman las cápsulas finales

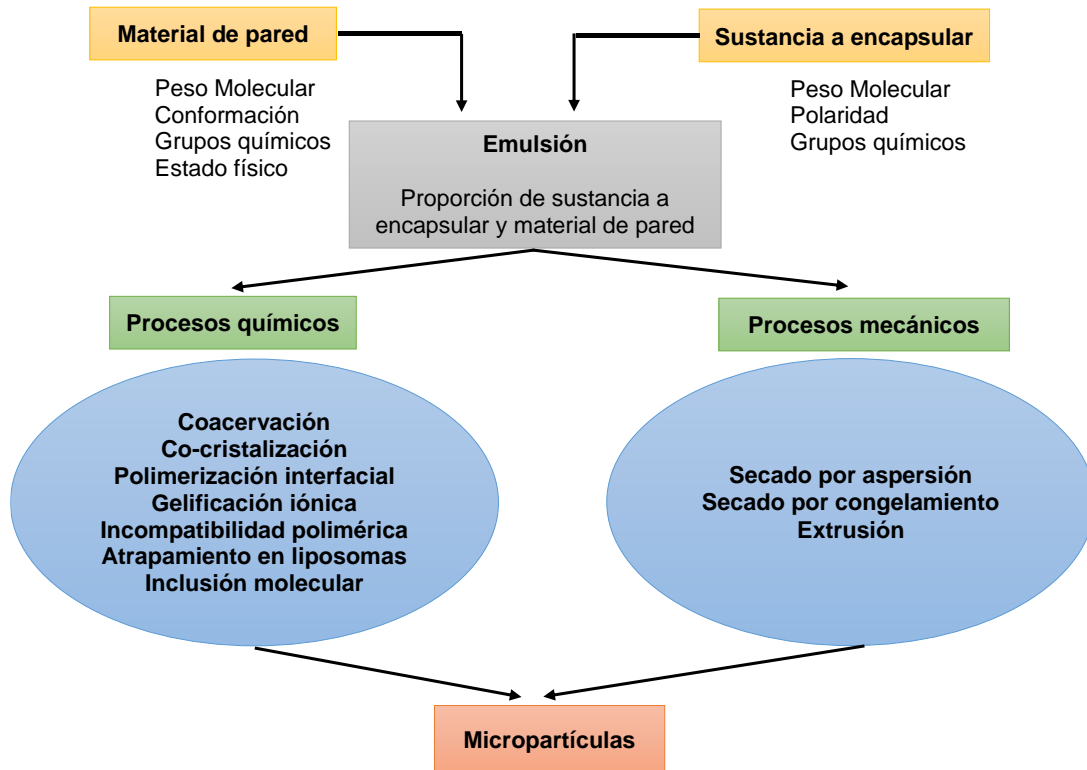


Figura 1. Esquema de las diferentes técnicas de microencapsulación
Fuente: (Madene et al., 2006)

Un aspecto importante a considerar es que el agente a encapsular debe ser compatible e insoluble (o escasamente soluble) con el biopolímero a utilizar (polielectrolitos de cargas opuestas), con el fin de formar los coacervados; pudiéndose utilizar un solo biopolímero (coacervación simple) o una mezcla de biopolímeros (coacervación compleja) (Madene et al., 2006).

No obstante, esta técnica no es muy común ya que es costosa y complicada, debido a que la concentración requerida para obtener una emulsión fina puede ser diferente de la necesaria para aumentar el rendimiento de encapsulación; además los coacervados presentan una alta inestabilidad, puesto que puede ocurrir la disolución del compuesto activo en el solvente, así como una oxidación del producto (Madene et al., 2006).

3.1.2.1.2 Co-cristalización

Es un proceso de microencapsulación por co-cristalización en una matriz de sacarosa; es un método relativamente nuevo y simple que ofrece una alternativa económica y flexible para

manejar y preservar diversos componentes activos utilizados en la industria alimentaria (Sardar & Singhal, 2013). En este proceso, el compuesto activo es incorporado en un conglomerado poroso de microcristales de sacarosa formados por cristalización espontánea; la co-cristalización ocurre por concentración de jarabes de sacarosa por evaporación a altas temperaturas hasta supersaturación, en donde se mantiene el material a encapsular con agitación constante; en este punto, la tasa de formación de cristales es tan alta que permite una nucleación y aglomeración del producto. Esto se evidencia por la turbidez observada en el jarabe debido a la formación de aglomerados irregulares (López-Córdoba et al., 2015).

La estructura del cristal de sacarosa puede ser modificada para formar agregados de cristales muy pequeños que incorporan jugos de frutas, aceites esenciales, saborizantes, aromatizantes y azúcar morena; sin embargo, durante el proceso, el compuesto a encapsular es transformado en gránulos secos y algunos compuestos termosensibles pueden ser degradados (Parras, 2011).

3.1.2.1.3 Polimerización interfacial

En este proceso se produce la polimerización de un monómero en la interface de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que dará lugar a la pared de la microcápsula (Islas, 2002). Este proceso tiene lugar en tres pasos (Parras, 2011):

1. Dispersión de una solución acuosa en una fase orgánica para producir una emulsión de agua en aceite.
2. Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua, iniciada por la adición de un complejo soluble en aceite a la emulsión anterior.
3. Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa. La separación de las microcápsulas se puede llevar a cabo por centrifugación.

3.1.2.1.4 Gelificación iónica

La microencapsulación por gelificación iónica o gelificación ionotrópica, comienza con una solución polimérica acuosa (polielectrolitos de cargas opuestas: alginato, la pectina de bajo metoxilo, la quitina, el quitosano) que contiene iones divalentes de baja masa molecular (calcio) que interactúan entre sí, para reaccionar y formar un gel insoluble (Kurozawa & Hubinger, 2017). El fundamento de esta técnica consiste en atrapar un compuesto activo y posteriormente liberarlo a través de cambios en la fase de gel.

Habitualmente en la gelificación iónica se utiliza alginato como componente de la membrana en combinación con iones divalentes como el calcio (Ca^{+2}) para inducir la gelificación. Esta interacción da lugar a un entrecruzamiento iónico entre los iones Ca^{+2} y las unidades de ácido gulurónico del alginato, dando lugar a un gel conocido como “modelo de caja de huevo”. Los iones se siguen difundiendo en el alginato, logrando que el gel se vaya endureciendo con el tiempo. Cabe mencionar que es posible manipular la dureza del gel formado modificando las condiciones de elaboración (pH, concentración de iones, concentración de alginato, etc.) (Islas, 2002).

Estequiométricamente se requiere de 7.2% de Ca^{+2} (basado en el peso del alginato de sodio) para una sustitución completa, sin embargo, con sólo 2.2% de Ca^{+2} se logra la formación del gel (Islas, 2002). Este Ca^{+2} puede ser difundido desde una fuente que rodee al hidrocoloide hacia la solución de alginato (gelificación externa), o, puede liberarse desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de alginato de sodio (Pasin et al., 2012).

Esta técnica es un procedimiento simple y fácil, no requiere equipo especializado, alta temperatura o solvente orgánico, por lo que puede considerarse de bajo costo (Aceval et al., 2016), sin embargo, una de sus desventajas es la aparición de gelificación heterogénea de partículas de gel debido al mecanismo de difusión, ya que la gelificación superficial a menudo ocurre antes de la gelificación del núcleo, que en este caso se convierte en un núcleo blando (Kurozawa & Hubinger, 2017).

3.1.2.1.5 Incompatibilidad polimérica

En este método se utiliza el fenómeno de separación de fases en una mezcla de dos polímeros químicamente diferentes e incompatibles en un mismo solvente. El material a encapsular interacciona sólo con uno de los dos polímeros adsorbiéndose en la superficie y formando una película que lo engloba. Este proceso se lleva a cabo en solventes orgánicos y cuando el material a encapsular es sólido (Parras, 2011).

3.1.2.1.6 Atrapamiento en liposomas

Es un método de encapsulación basado en lípidos no tóxicos que forman bicapas de fosfolípidos que separan dos compartimentos acuosos; por su estructura se consideran moléculas anfifílicas, lo que les permite atrapar compuestos hidrófilos e hidrófobos (Azzi et al., 2018).

La técnica de elaboración de referencia emplea un evaporador rotatorio, sin embargo, existen otras técnicas como la diálisis y el secado por aspersión. Las capsulas formadas con esta técnica de encapsulación suelen ser fáciles de destruir por medio de una concentración crítica de iones de calcio o por un cambio de pH; sin embargo, en ocasiones, el carácter hidrófobo de las cápsulas limita sus aplicaciones (Islas, 2002).

3.1.2.1.7 Inclusión molecular

Los cápsulas de inclusión molecular se definen como el resultado de las interacciones entre compuestos, en los que una molécula pequeña se acopla y está rodeada por la red del otro, que es el agente encapsulante y en la mayoría de los casos, es la ciclodextrina (Parras, 2011). Este biopolímero se utiliza debido a que cuenta con una cavidad hidrofóbica interna que le permite la inclusión total o parcial de una amplia gama de compuestos aromáticos; además su superficie externa tiene un carácter hidrofílico (Madene et al., 2006).

3.1.2.2 Procesos mecánicos

3.1.2.2.1 Extrusión

La extrusión es considerada como la segunda técnica más usada en la microencapsulación. Su fundamento involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared a través de un molde a alta presión (dispositivo extrusor), extrudiendo la mezcla en forma de esferitas (pellets) dentro de un baño con un disolvente frío que contiene un ion divalente para inducir una gelificación externa, por lo que el material de pared se convierte en un sólido amorfo, que recubre el compuesto activo (Parras, 2011). Las microcápsulas formadas son desecadas para endurecer la masa extruida; el líquido más utilizado para el proceso de deshidratación y endurecimiento es el alcohol isopropílico (Madene et al., 2006).

Los polisacáridos que se usan ampliamente como encapsulantes en esta técnica debido a su baja permeabilidad al oxígeno son el alginato y las pectinas (Wang et al., 2013) y han sido empleados para encapsular aminoácidos, vitaminas, minerales, antioxidantes, colorantes, enzimas y edulcorantes para aplicarse a diversas ramas de la industria (Pan-utai & Iamtham, 2018).

A diferencia de la gelificación iónica, en la extrusión se utilizan polímeros en estado vítreo para la formación de las microcápsulas, dándole estabilidad al material encapsulado. La principal limitación de esta técnica ha sido el gran tamaño de las microcápsulas, lo cual depende del

diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor. La principal ventaja del método de extrusión es la estabilidad de los sabores (Madene et al., 2006).

3.1.2.2.2 Secado por congelamiento/enfriamiento

Esta técnica involucra la dispersión del material a encapsular en una grasa fundida o cera (agente encapsulante), esta dispersión es atomizada por medio de aire frío, esta reducción de temperatura produce una solidificación del lípido de pared y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula (Parras, 2011).

En la aspersión por congelamiento, el material de cubierta es derretido y atomizado a través de una boquilla neumática en un recipiente, generalmente este contiene un baño de hielo de dióxido de carbono (CO₂), (temperatura -50°C) en una cama fluidizada derretida. Así, las gotas se adhieren sobre las partículas y forman una película de cubierta solidificada. Estos procesos son adecuados para la protección de algunos materiales hidrosolubles, que de otro modo pueden volatilizarse o dañarse durante el procesamiento térmico (Madene et al., 2006).

3.1.2.2.3 Liofilización

En esta técnica, el agua se elimina de una solución acuosa por sublimación, dejando un producto deshidratado. Durante el proceso de sublimación, el producto seco se vuelve poroso; sin embargo, si la temperatura de fusión es superior a la temperatura de transición vítrea (T_g) del producto seco, el producto se colapsará o encogerá (Charoenviriyakul et al., 2018; Ravnik et al., 2018).

Debido a la ausencia de agua líquida, aire y las bajas temperaturas de operación, se previene o limita el deterioro del producto debido a reacciones microbianas, oxidación u otras reacciones químicas. Sin embargo, en comparación con el secado por pulverización, la liofilización es de 30 a 50 veces más costosa. Dado que el proceso se basa en soluciones acuosas, se deduce que el material de la pared debe ser soluble en agua (Labuschagne, 2018).

3.1.2.2.4 Secado por aspersión

Esta técnica se basa en la preparación de una mezcla líquida (emulsión/suspensión) que contenga el compuesto a encapsular y el agente encapsulante (polímero), la suspensión es introducida a un equipo conocido como *secador por aspersión* (Figura 2), en donde al entrar en contacto con el aire caliente se logra la evaporación instantánea del agua, permitiendo que el

principio activo presente quede atrapado dentro de una matriz de material encapsulante (Labuschagne, 2018).

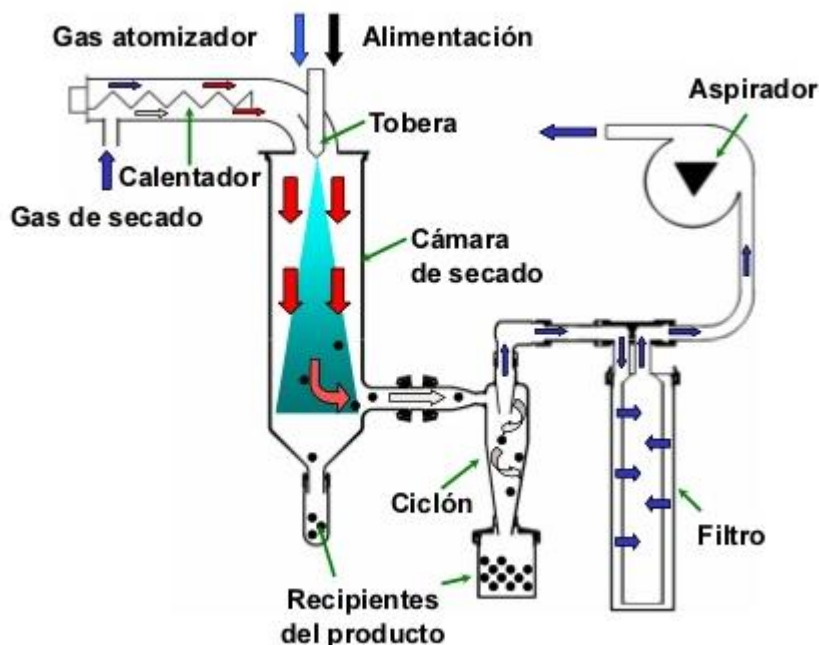


Figura 2. Esquema de un *secador por aspersión*
Fuente: Buchi Labortechnik AG

Se considera la tecnología más usada por la industria para el proceso de microencapsulación debido a su fácil reproducibilidad, disponibilidad de equipos, bajos costos de procesamiento y buena estabilidad del producto final (Parras, 2011). Además, proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta (entre 96 y 100%), en comparación con otros métodos (Lobato et al., 2008). Sus principales ventajas son:

1. Proteger el material activo de la degradación ocasionada por factores ambientales (calor, aire, luz, humedad).
2. El compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado en un punto determinado.
3. Las características físicas del material original pueden ser modificadas y hacer más fácil su manejo (un material líquido convertido a polvo), la higroscopía puede ser reducida,

la densidad se modifica y el contenido puede ser distribuido uniformemente en una muestra.

4. El sabor y el olor del compuesto puede ser enmascarado.
5. Estabilización de principios activos inestables.
6. Transformación de líquidos en sólidos

Dentro de los parámetros más importantes a controlar durante el secado por aspersión se encuentran: la selección del tipo de atomizador considerando la viscosidad de la solución, así como el tamaño de gota deseado a fin de generar la mayor superficie de contacto entre el aire caliente y el líquido, la forma de contacto entre las gotas y el aire caliente dependiendo de la sensibilidad al calor del producto, el tiempo de contacto gota-aire, la temperatura del aire y por último el tipo de método de separación de los sólidos secos (Pasin et al., 2012). El descuido de alguno de estos parámetros puede afectar al compuesto a encapsular, o, afectar negativamente la morfología de las microcápsulas.

3.1.2.2.4.1 Materiales de pared para el secado por aspersión

Los agentes encapsulantes más utilizados en el secado por aspersión son: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa y derivados); gomas (arábica, mezquite, alginato de sodio); lípidos (ceras, parafinas, grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína). Desde luego que el tipo de material encapsulante tendrá influencia en la estabilidad de la emulsión antes de secar, en el tamaño de partícula, en las propiedades de flujo, en las mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (Islas, 2002). En la Tabla 1 se enumeran las principales funciones de los materiales de pared más comunes de grado alimenticio.

3.1.2.2.4.1.1 Carbohidratos

Los carbohidratos se utilizan ampliamente como material de pared para la encapsulación de ingredientes alimentarios debido a su capacidad para formar sólidos vítreos amorfos que proporcionan soporte estructural al material de pared del sistema de suministro. Además, existe una amplia diversidad, son de bajo costo y uso generalizado en los alimentos, lo que los convierte en la opción preferida para la encapsulación (Labuschagne, 2018).

Tabla 1. Funciones de materiales de pared

| Categoría | Material de pared | Principales funciones |
|------------------|---|---|
| Carbohidratos | Almidón | Sólido vítreo, enlaza sabores/compuestos activos |
| | Dextrina | Sólido vítreo, formación de películas |
| | Maltodextrina | Formación de películas, enlaza sabores/activos, formación de matriz |
| | Ciclodextrina | Enlaza sabores/activos, emulsificante |
| | Almidón modificado | Buen emulsificante |
| | Quitosano | Enlaza sabores/activos, formación de complejos |
| | Pectinas | Emulsificante, estabilizante, formación de gel |
| | Celulosa modificada (metil celulosa, carboximetil celulosa) | Formación de películas |
| Proteínas | Suero de leche | Emulsificante, formación de películas |
| | Soya | Emulsificante |
| | Caseína | Formación de película, emulsificante |
| | Gelatina | Emulsificante, formación de película |
| Gomas | Arábica (acacia) | Emulsificante, formación de película, sólido vítreo |
| | Almendra | Emulsificante, sólido vítreo |
| | Mesquite | Emulsificante, sólido vítreo, enlaza sabores |
| | Alginato de sodio | Formación de gel, espesante |
| Lípidos | Ceras, parafinas, grasas (hidrogenadas) | Barrera al O ₂ y al agua |

Fuente: (Labuschagne, 2018)

3.1.2.2.4.1.2 Proteínas

Las proteínas y los aislados que contienen proteínas consisten en una amplia gama de grupos funcionales que imparten propiedades anfifílicas y, por lo tanto, excelentes capacidades de emulsificación; sus capacidades de formación de películas y la capacidad de autoasociarse en redes las hacen útiles como material de pared para producir micropartículas con superficies lisas y sin abolladuras. Los principales inconvenientes son los altos costos y la escasa solubilidad en agua fría (Labuschagne, 2018).

La proteína del chícharo se ha sugerido como un biopolímero con aplicaciones potenciales en el área de alimentos, teniendo en cuenta su precio bajo, la falta de alteraciones genéticas, así como el hecho de que la proteína del guisante no es un alergeno común. Estudios recientes demuestran que el aislado de proteína de chícharo es un excelente material de pared para la protección de compuestos bioactivos cuando se combina con algunas gomas y carbohidratos (Aguilar-Vázquez et al., 2018), debido a que confiere propiedades funcionales como la solubilidad, emulsificación y formación de espuma (Warnakulasuriya et al., 2018).

3.1.2.2.4.1.3 Gomas

Son moléculas de alto peso molecular con características hidrofílicas o hidrofóbicas que, al dispersarse en agua presentan propiedades coloidales, emulsificantes, estabilizantes y espesantes. Se obtienen de exudados y semillas de plantas, algas, productos de la biosíntesis de microorganismos, y la modificación química de polisacáridos naturales (Pasquel, 2001).

La goma más popular para usar como material de pared es la goma arábiga, también conocida como goma acacia. Su popularidad se debe a una combinación de características favorables tales como: capacidad de formación de película, solubilidad acuosa, baja viscosidad, buena retención de componentes volátiles y propiedades emulsionantes, todo lo cual se origina a partir de una pequeña fracción de proteína presente en la goma. Sin embargo, su aplicación está limitada debido a una serie de factores como: alto costo, disponibilidad limitada (300 g/planta/año) y la presencia de impurezas (Labuschagne, 2018).

3.2 Pectina

La pectina es un biopolímero considerado como uno de los polisacáridos más complejos en las paredes celulares de las plantas debido a su diversidad estructural; se localiza principalmente en

la laminilla media, y constituye alrededor del 40% de la base de materia seca de la pared celular (Abid et al., 2017).

En la industria alimentaria, la pectina se considera una fibra soluble e indigerible, que cuando se combina con agua forma un sistema coloidal y geles (López et al., 2011) que se utilizan en diversos productos alimenticios (Naqash et al., 2017). También se conoce como agente nutracéutico y funcional, ya que tiene efectos positivos en la salud humana, así como múltiples usos biomédicos (Noreen et al., 2017; Zhang et al., 2015).

La estructura de la pectina es un heteropolisacárido de alto peso molecular, compuesto por una cadena lineal de ácido galacturónico unido mediante enlaces covalentes (Figura 3A). A lo largo de esta cadena se encuentran ramificaciones de regiones homólogas (Homogalacturonanos) y regiones diversificadas (Ramnogalacturonanos tipo I y II) (Koubala et al., 2008). Con base en esto, se dice que la pectina se compone de tres co-polímeros (Figura 3B): el homogalacturonano (HG), que comprende la cadena principal de la pectina, formada de enlaces α -(1-4) de ácido D-galacturónico los cuales pueden estar parcialmente esterificados con grupos metilo en el carbono 6 y posiblemente con un grupo acetilo esterificado en el carbono 2 ó 3; el ramnogalacturonano I (RG-I), que conforma zonas ramificadas con repeticiones del disacárido (1-2)- α -L-ramnosa-(1-4)- α -D-galacturónico; y el ramnogalacturonano II (RG-II), que está conformado por residuos de galactosa, arabinosa y ramosa unidos al ácido D-galacturónico mediante enlaces α -(1-4). Estos co-polímeros pueden contener residuos de azúcares neutros principalmente arabinosa y galactosa, aunque también pueden contener xilosa, ramnosa y glucosa, en forma de regiones ramificadas o cadenas laterales (Lefsih et al., 2016; López et al., 2011; Onyango et al., 2017; Ridley et al., 2001).

La presencia de algunos grupos funcionales en la estructura de la pectina le proporciona propiedades específicas; tal es el caso del metilo que esterifica a los grupos carboxilo, y que asigna un cierto grado de metil-esterificación o metoxilación (GE o GM respectivamente) a la pectina; lo que resulta en su clasificación como pectinas de alto metoxilo y bajo metoxilo dependiendo de si el GM es mayor o menor del 50%, respectivamente (Petkowicz et al., 2017; Adetunji et al., 2017).

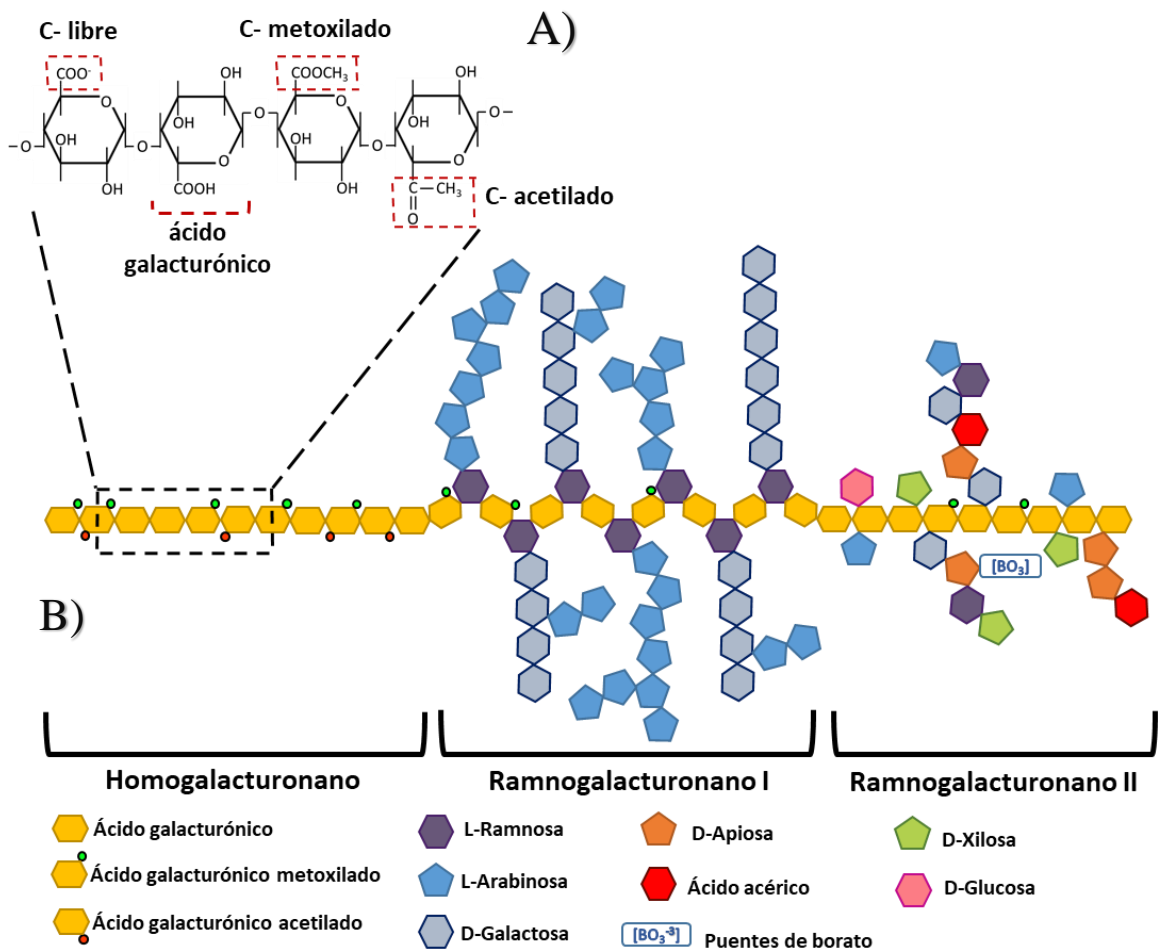


Figura 3. Estructura molecular de la pectina, a) Estructura general y b) Cadena principal.
Fuente: Elaboración propia

3.2.1 Propiedades bio-funcionales

En cuestiones de salud, se ha reportado que la pectina exhibe diversas funciones que favorecen efectos benéficos: la reducción del colesterol, la disminución de la glucosa sérica, algunas actividades anticancerígenas e incluso un elevado potencial prebiótico. No obstante, estas actividades biofuncionales dependen del tamaño de la cadena y la presencia de dominios estructurales específicos en ella (Liu et al., 2016; Naqash et al., 2017).

En este sentido, una de las principales propiedades biofuncionales de la pectina puede ser su efectivo potencial prebiótico; ya que una vez que las cadenas pécticas llegan al colon son

fermentadas por la flora microbiana, lo que promueve el crecimiento selectivo de bacterias intestinales beneficiosas que producen metabolitos secundarios que desencadenan una serie de efectos favorables en el organismo: mejora frente a infecciones, inactivación de compuestos tóxicos, fortalecimiento del sistema inmunológico, y la eliminación de sustancias potencialmente cancerígenas (Fanaro et al., 2005).

3.2.2 Propiedades tecno-funcionales

Estas propiedades son las que le confieren el uso como gelificante, emulsificante y estabilizante. Algunas están en función del grado de metoxilación (GM), tal y como sucede con su mecanismo de gelificación (Fraeye et al., 2010). Para formar geles con pectinas de alto metoxilo se requieren pHs bajos, evitando así la ionización de los grupos carboxilo y la repulsión entre sus cargas para favorecer su unión a través de interacciones hidrofóbicas o mediante puentes de hidrógeno, siempre y cuando esté presente un material muy hidrófilo (azúcar) que retire el agua. Mientras que en el caso de pectinas de bajo metoxilo, el mecanismo de gelificación es distinto, ya que la unión entre cadenas se produce a través de iones de calcio, que forman puentes entre las cargas negativas de los grupos carboxilo no esterificados (Calvo, 2018).

Existen pectinas de alto metoxilo ($GM > 60\%$), como la pectina de sandía, que han sido reportadas con propiedades espumantes y emulsificantes, y debido a que presentan una viscosidad relativamente alta, pueden ser adecuadas para su uso como agentes espesantes (Petkowicz et al., 2017). Mientras que las pectinas de bajo metoxilo, como es el caso de la pectina extraída de cáscaras de melón ($GM < 29\%$), presentan propiedades de gelificación y emulsificación débiles (35%) (Raji et al., 2017). El GM es independiente del tamaño de la cadena de pectina, ya que las pectinas de mayor tamaño proporcionan una viscosidad alta con respecto a las pectinas de cadena corta, siendo que ambas pueden ser de alto o bajo metoxilo.

Se han descrito propiedades similares entre pectinas de distintas fuentes; como es el caso de la pectina de remolacha, que fue reportada con excelentes propiedades emulsionantes (Naqash et al., 2017), al igual que la pectina de okra, que se considera como un efectivo agente emulsificante (Alba et al., 2013). Sin embargo, se ha reportado la influencia que tiene la versatilidad de las pectinas en sus propiedades tecno-funcionales (Morales et al., 2017), por lo que en la mayoría de los casos tienden a ser distintas según su fuente de origen.

3.2.3 Fuentes de pectina

La pectina se halla de forma natural en diversas matrices de origen vegetal, en donde representa gran parte de la pared celular primaria (Figura 4); es más abundante e importante cuando se encuentra en frutos inmaduros, y en algunos tejidos blandos como los cítricos, manzanas, peras, entre otros (Badui, 2006).

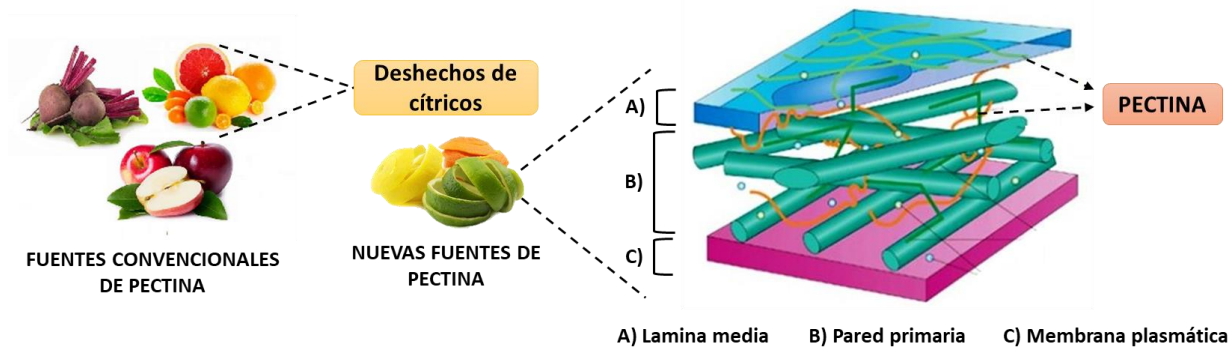


Figura 4. Fuentes de pectina.
Fuente: Elaboración propia

3.2.3.1 Fuentes convencionales

En el pasado, las fuentes utilizadas para obtener pectina comercial con fines alimenticios eran las cáscaras de las manzanas, cuya pectina se utilizaban para hacer gelatinas y conservas. Posteriormente, la industria de alimentos creció, y también lo hizo la necesidad de una fuente de pectina más estable y práctica; como son las cáscaras de cítricos (Kamozawa & Talbot, 2008), las cuales contienen altas cantidades de sustancias pécticas, por lo que se considera que estos frutos son las principales fuentes de pectina.

3.2.3.2 Otras fuentes de pectina

Recientemente, y debido a la alta demanda de pectina, se han reportado nuevas fuentes de este carbohidrato alternas a las convencionales, las cuales proceden principalmente de productos de desecho como la alcachofa (Sabater et al., 2018), tomate (Morales-Contreras et al., 2018), y yaca (Xu et al., 2018), esto con el fin de proporcionar valor agregado y económico.

Ejemplo de esto desechos son las cáscaras, bagazos y semillas de cítricos, que actualmente están disponibles en abundancia debido a la producción de jugos y zumos, y que además son subproductos de una de las principales fuentes de pectina (Dranca & Oroian, 2018), por lo que con el aprovechamiento de las grandes cantidades de biomasa generada se pueden minimizar los problemas ambientales y fitosanitarios que estos ocasionan.

3.2.4 Extracción de pectina

3.2.4.1 Extracción convencional (EC)

Independientemente de la fuente de materia prima que se utilice, la hidrólisis ácida es el método más conocido para extraer pectina (Baltazar et al., 2013). La temperatura, el tiempo de extracción y el pH son los principales factores que influyen en la extracción de pectina, por lo que generalmente se usa agua acidificada en un intervalo de pH entre 1.5 y 3. Se puede usar ácido sulfúrico, fosfórico, nítrico, clorhídrico o cítrico a altas temperaturas (70-90°C) durante 0.5 a 6h (Y. Xu et al., 2014). Después de la hidrólisis, la pectina solubilizada es precipitada con etanol, recuperada, secada y finalmente pulverizada para su almacenamiento y uso (Figura 5) (Adetunji et al., 2017).

Debido a que este método es sencillo y fácil de reproducir, se considera el convencional (clásico o tradicional) para obtener pectina a nivel industrial; sin embargo, en ocasiones la sinergia del efecto térmico e hidrolítico causa inestabilidad en la cadena principal de la pectina que tiende a descomponerse, es decir, se produce una despolimerización en donde los enlaces que unen los grupos galacturónicos se rompen para dar cadenas mucho más cortas o incluso monómeros (Yeoh et al., 2008); de igual manera, el rendimiento de extracción depende mucho de estas condiciones (Aldana-Villarruel et al., 2011). Además, este método de extracción requiere de un elevado consumo de energía, contraponiéndose a la tendencia actual de utilizar métodos de producción cada vez más eficientes energéticamente en el ámbito industrial (Zegada, 2015), por lo que actualmente se exploran nuevos métodos para evitar el uso de condiciones extremas durante la extracción.

3.2.4.2 Métodos de extracción alternativos

Se han descrito algunos métodos alternativos para extraer pectina (Figura 5), tales como: la extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas, la extracción asistida por ultrasonido, extracción enzimática, y recientemente la extracción electromagnética

(González-Centeno et al., 2014; Adetunji et al., 2017; Zouambia et al., 2017). Estos métodos se consideran como tecnologías más respetuosas con el medio ambiente, además de ser eficientes energéticamente en la recuperación de la pectina a partir de residuos agroindustriales.

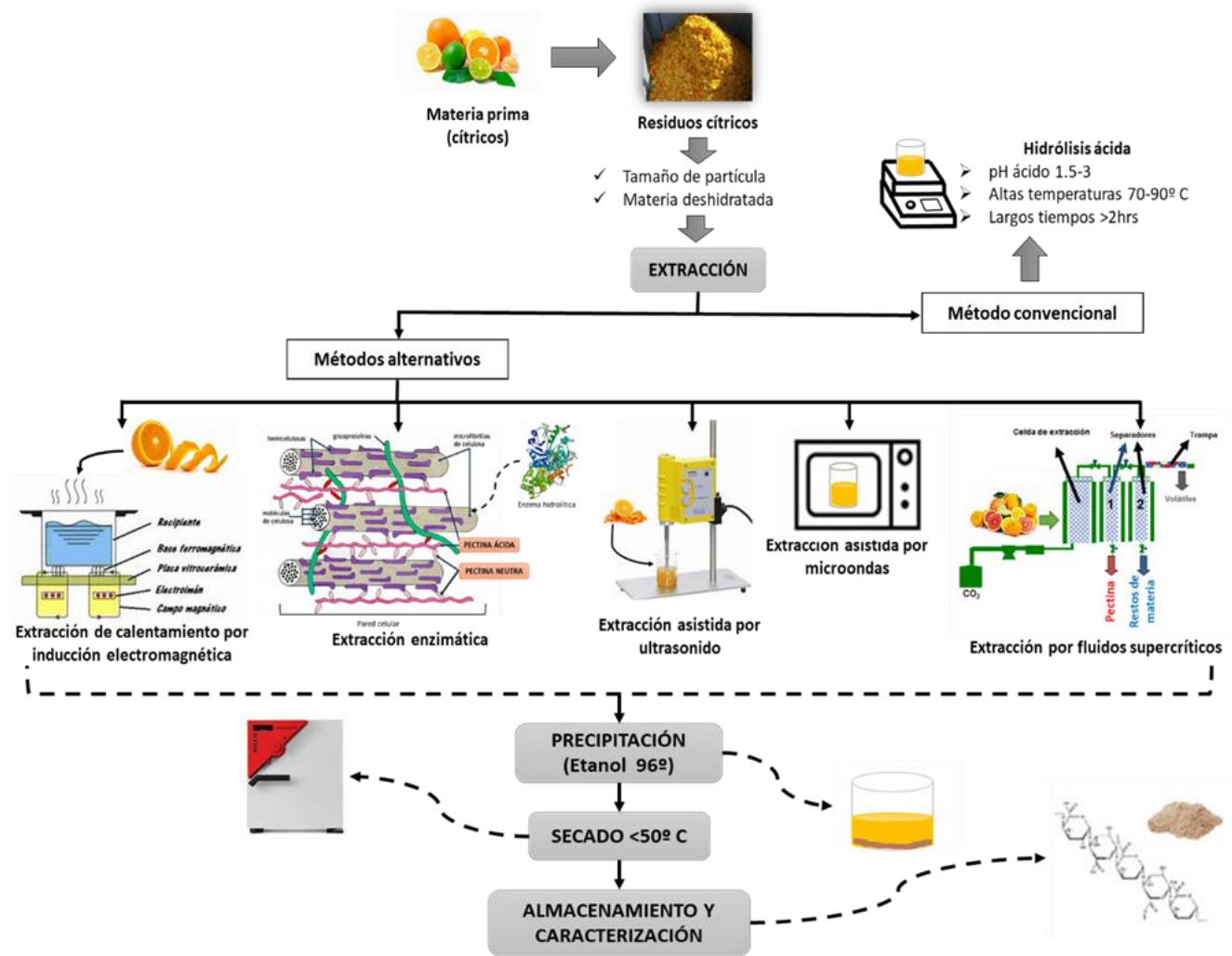


Figura 5. Métodos de extracción de pectina.
Fuente: Elaboración propia basada de Adetunji et al. (2017).

3.2.4.2.1 Extracción con calentamiento por inducción electromagnética (ECIE)

El calentamiento por inducción electromagnética consiste en la aplicación de calor hacia un material a través de un campo electromagnético de forma rápida, consistente, limpia, precisa, controlable y eficiente (González, 2005). El principio de este método se basa en una corriente eléctrica que circula por un material conductor para generar un campo magnético que se mueve

a través del flujo de dicha corriente, ocasionando una interacción (resistencia) de electrones, lo que se manifiesta en forma de calor.

El uso del calentamiento por inducción por campo magnético para la extracción de compuestos a partir de materia vegetal ha sido comparado con los métodos convencionales de extracción. Por ejemplo, se han reportado eficiencias altas de extracción del aceite esencial de semillas de alcaravea (Rivera & Vilarem, 2007); en cuanto a la extracción de pectina, se utilizó para extraer pectina del híbrido de la naranja dulce (llamado citrange) (Zouambia et al., 2017), reportando mayores rendimientos de extracción en un menor tiempo en comparación con el método convencional; además las propiedades y estructura de la pectina obtenida por este nuevo método no se vio afectada por efecto de la radiación. Sin embargo, a pesar de las ventajas que se han reportado sobre este método, aún se considera una técnica en etapa de investigación, lo que limita su posible aplicación comercial en la industria.

3.2.4.2.2 Extracción asistida por enzimas (EAE)

Las enzimas se han reportado como un método de extracción alternativo para obtener pectina, debido a que son capaces de hidrolizar la materia prima tal y como ocurre en el método tradicional (Adetunji et al., 2017), pero con la ventaja de reducir la cantidad de solvente o de aumentar del rendimiento para la misma cantidad de solvente (Puri et al., 2012).

Se han reportado con este método rendimientos de extracción de pectinas de achicoria y coliflor superiores en comparación con el método tradicional (Panouillé et al., 2006), debido a que el uso de enzimas específicas permite un alto nivel de selectividad al degradar los componentes de la pared celular unidos a la pectina (Puri et al., 2012). Este tipo de extracción representa una oportunidad de uso en la obtención de pectinas a partir de subproductos agroindustriales de algunos cítricos como la lima (Dominiak et al., 2014; Naghshineh et al., 2013), los cuales por el desgaste de la materia orgánica no pueden ser sometidos a métodos violentos de extracción.

3.2.4.2.3 Extracción asistida por microondas (EAM)

La extracción de pectina usando el microondas consiste en la generación de un campo electromagnético que emite una frecuencia sobre la materia prima provocando una rotación desorganizada de las moléculas polares y desplazamiento de algunos iones, y que a su vez genera energía en forma de calor (Adetunji et al., 2017). El uso exitoso de la extracción asistida por microondas (EAM) de la pectina depende de las propiedades dieléctricas del solvente (agua

acidificada), otras propiedades del solvente (naturaleza y el volumen), potencia de microondas (densidad de energía), la temperatura y el contenido de humedad de la matriz (Venkatesh & Raghavan, 2004).

El uso de la EAM para extraer pectina de materias primas procesadas y/o tratadas, como son los subproductos agroindustriales, transmite eficientemente la energía térmica a la materia a través de la interacción molecular con el campo electromagnético, mientras que en otros métodos es necesario que la energía se transfiera por medio de gradientes térmicos en la superficie de la materia prima (Venkatesh & Raghavan, 2004). Además, la EAM se considera una técnica de química verde, ya que reduce el consumo de energía y la cantidad de disolventes orgánicos; por lo tanto, disminuye la cantidad de desechos y hace posible obtener un mejor rendimiento en comparación con el método tradicional (Lefsih et al., 2017; Shah & Mohanraj, 2014).

En los últimos años, la extracción de pectina de nuevas fuentes se ha centrado en utilizar y analizar la EAM con el fin de entender su funcionamiento; tal es el caso de Prakash et al. (2013) que optimizaron la extracción de pectina a partir de cáscara de naranja; Lefsih et al. (2017) optimizaron la extracción de pectina usando cladodios de *Opuntia ficus-indica* como materia prima teniendo un rendimiento del 12.57%; Hosseini et al. (2016) lograron obtener un rendimiento óptimo del 29.1% de la pectina de la cáscara de naranja agria; Shah & Mohanraj (2014) reportaron un rendimiento de 2.18% a partir de una optimización realizada de extraer la pectina de las cáscaras de plátano.

3.2.4.2.4 Extracción por fluidos supercríticos (EFS)

Durante el proceso de extracción de pectina usando fluidos supercríticos la materia prima es sometida a agua líquida a presión elevada que puede alcanzar temperaturas más altas que su punto de ebullición normal sin un cambio de fase (Adetunji et al., 2017); modificando las propiedades químicas del agua para extraer compuestos sin importar su polaridad y grado iónico (Brunner, 2009); además, se generan ventajas físicas tales como una alta difusión y mayor tasa de transferencia de masa (Zakaria & Kamal, 2016) lo que contribuye a un mejor proceso de extracción de pectina.

Al igual que en otros métodos de extracción el tiempo de extracción es un factor clave durante la EFS, ya que un período de extracción excesivamente largo podría dar como resultado la

degradación, debido a las temperaturas tan altas a las que se lleva a cabo (Chen et al., 2015), por lo que el tiempo debe de considerarse durante el proceso de optimización.

Se han realizado algunos estudios en donde, utilizando la EFS, se ha logrado extraer pectina de varias matrices vegetales como la cáscara de *Citrus junos* (Ueno et al., 2008) y la pulpa de remolacha azucarera (Chen et al., 2015); sin embargo, el costo de implementación de esta técnica puede considerarse la principal limitación para extraer pectina con fines alimentarios, debido a que su extracción a gran escala resultaría incosteable.

3.2.4.2.5 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Una tecnología aplicable e innovadora para extraer pectina es la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU). El fundamento de esta técnica se basa en el fenómeno de cavitación acústica (Medina-Torres et al., 2017), que es capaz de dañar las paredes celulares de la materia prima y, por lo tanto, favorecer la liberación de pectina.

Durante la extracción asistida por ultrasonido se propagan ondas de sonido de frecuencia elevada a través de un medio líquido que sirve como solvente para extraer la pectina (Luque-García & Luque, 2003); estas ondas, formadas por un conjunto de ciclos de altas y bajas presiones (llamadas compresiones y rarefacciones respectivamente), causan la formación de burbujas y/o cavidades como resultado de cambios en la temperatura y la presión en el solvente, dichas burbujas sufren un colapso implosivo conocido como cavitación (Amirante et al., 2017; Zhang et al., 2017). Esta cavitación puede ocasionar la fragmentación de las matrices vegetales provocando una reducción en el tamaño de partícula, lo que facilita la transferencia de masa o la erosión, que ayuda a mejorar la accesibilidad y penetración del solvente a la matriz de la planta a través de los canales producidos por la implosión de las burbujas y la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares (Medina-Torres et al., 2017).

En este método es importante tener en cuenta algunos factores que controlan las ondas de ultrasonido, tales como (Medina-Torres et al., 2017):

- Longitud: es la distancia entre una compresión y rarefacción.
- Amplitud (%): altura máxima de una onda de ultrasonido.
- Frecuencia (Hz): se considera el número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): es el producto de la frecuencia por la longitud de onda.

- Potencia (W): relación entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad: relación de una unidad de potencia en un área de unidad (W/cm^2).

Un control inadecuado de dichos factores puede producir ondas ultrasónicas capaces de dañar fuertemente la matriz vegetal (principalmente cuando se trata de subproductos agroindustriales que han sido fuertemente procesados) permitiendo una mayor extracción de pectina; e incluso, tal y como lo describen Wang et al. (2018) pueden llegar a modificar la estructura de la pectina disuelta en el solvente (des-polimerizarla). De igual manera, es importante considerar el tiempo de sonicación, la temperatura del medio, así como también las condiciones de la materia prima (relación biomasa-solvente y tamaño de partícula) cuando se buscan rendimientos de extracción elevados (Wang & Weller, 2006).

Pese a todo, se ha reportado el uso de algunos de estos subproductos/residuos para obtener pectina utilizando la EAU tal y como se muestran en la Tabla 2.

A pesar de que los rendimientos generados en la EAU no son el mayor beneficio de esta técnica, y más aún cuando se trata de materias primas de deshecho, su principal ventaja es debido a una disminución en los tiempos de extracción y uso de solventes, lo que puede significar una reducción considerable de costos cuando se quiera escalar el proceso.

3.2.5 Usos y aplicaciones

Las propiedades y estructura que se obtienen al extraer la pectina por métodos convencionales pueden cambiar cuando se utilizan otros métodos de extracción, es por eso que las aplicaciones de la pectina están relacionadas con sus propiedades y forma de extraerlas.

La pectina contribuye a mejorar la textura de frutas y verduras cuando forman parte de su estructura (Wicker et al., 2014); pero una vez que se extrae, puede tener diversas aplicaciones, principalmente en la industria de alimentos y farmacéutica. La Tabla 3 muestra algunos usos que se da a las pectinas.

No obstante, de las numerosas aplicaciones que tiene la pectina, recientemente se ha centrado su estudio en la formación de sistemas de liberación controlada de compuestos activos, ya que este biopolímero natural puede emplearse como vehículo inerte y biocompatible.

Tabla 2. Pectinas obtenidas a partir de Extracción Asistida por Ultrasonido

| Fuente (subproducto) | Procesamiento | % rendimiento | Referencia |
|--------------------------------|--|----------------------|------------------------------------|
| Cáscara de mango | 1:40 (p/v), pH 2.5 con ácido cítrico, 80° C, irradiación de 20 kHz y 500 W durante 15 minutos. | 17.15% | (Wang et al., 2016) |
| Cáscaras de maracuyá | 1:30 (p/v), pH 2 con HNO ₃ , 85° C, irradiación de 20 kHz y 663 W durante 10 minutos. | 12.67% | (Freitas de Oliveira et al., 2016) |
| Residuos de tomate | Acidificado con ácido oxálico, 80° C, irradiación de 37 kHz durante 15 minutos. | 16.3-18.5% | (Grassino et al., 2016) |
| Residuos de plátano | 1:15 (p/v), pH 3.2 con ácido cítrico, irradiación de 20 kHz y 323 W durante 27 minutos. | 8.99% | (Prakash Maran et al., 2017) |
| Cáscara de granada | 1:17 (p/v), pH 1.27, 61° C, irradiación de 20 kHz y 130 W durante 28 minutos. | 23.87% | (Ganesh et al., 2015) |
| Residuos de cabezas de girasol | 1:15 (p/v), pH 3.2 con ácido cítrico, irradiación de 20 kHz y 375 W durante 32 minutos. | 8.89% | (Ponmurugan et al., 2017) |
| Residuos de henequén | 1:28 (p/v), 50° C, irradiación 20 kHz y 61 W durante 26 minutos. | 29.32% | (Prakash & Priya, 2015) |

Tabla 3. Aplicaciones de la pectina

| Campo de aplicación | Propiedades proporcionadas | Productos donde se aplica | Referencia |
|-------------------------------|------------------------------------|--|---|
| Industria de alimentos | Funcional (prebiótico) | Se usa como fibra dietética soluble | (Zhang et al., 2015; Hotchkiss et al., 2003) |
| | Gelificante | Elaboración de mermeladas y jaleas | (Srivastava & Malviya, 2011) |
| | Estabilizante | Estabilizador eficaz de zumos de frutas y las bebidas lácteas acidificadas | (Srivastava & Malviya, 2011) |
| | Emulsionante (sustituto de grasas) | En la elaboración de productos para untar, helados y productos cárnicos emulsionados | (Prakash et al., 2013; Mungure et al., 2018) |
| | Recubrimientos | Formación de biopelículas en frutas | (Bartolomeu et al., 2012; Da Silva et al., 2018) |
| Industria cosmética | Espesante | Elaboración de preparaciones cosméticas, como cremas y lociones | (Noreen et al., 2017)no |
| Industria farmacéutica | Formación de matrices | Vehículo de compuestos activos en fármacos | (Wicker et al., 2014; Munarin et al., 2012; Chomto & Nunthanid, 2017) |
| | Encapsulante | Como un portador de aceites esenciales y/o sus componentes activos | (Guerreiro et al., 2015) |
| | Inmovilizador | Capacidad para inmovilizar células, genes, proteínas, fármacos | (Munarin et al., 2012) |
| Medicina y área clínica | Hipolipemiente | Diseño de compuestos que disminuyen la grasa en la sangre | (Liu et al., 2010) |
| | Anti cancerígeno | Previene la metástasis espontánea del cáncer | (Liu et al., 2010; Liu et al., 2016) |
| | Cicatrizante | Ayuda en la cicatrización de heridas | (Munarin et al., 2012) |
| | Aglutinante | Elaboración de parches para heridas | (Munarin et al., 2012) |
| Genética y biología molecular | Formación de matrices | Administración de genes e ingeniería de tejidos | (Munarin et al., 2012) |

3.2.5.1 La pectina como agente encapsulante

Según Munarin et al. (2012), la pectina tiene propiedades interesantes en la liberación controlada de compuestos activos en el organismo, tales como: la facilidad de disolución en entornos básicos, la muco-adhesividad, y la capacidad de formar geles en entornos ácidos; las dos últimas se deben a los grupos funcionales en la estructura de la pectina, ya que éstos ácidos libres pueden formar puentes de hidrógeno con la mucosa (Sriamornsak et al., 2010).

La muco-adhesividad de las pectinas, puede emplearse principalmente para la administración controlada de compuestos activos en el ambiente nasal o gástrico, mientras que la facilidad de disolución en entornos básicos, asociada a su resistencia a proteasas y amilasas activas en el tracto gastrointestinal, y que adicionalmente son degradadas por la microflora intestinal, hace que la pectina sea adecuada para liberar compuestos activos en el colon (Ludwig, 2005; Paharia et al., 2007; Sriamornsak et al., 2010).

Existen estudios donde se han empezado a desarrollar procesos de encapsulación con pectina como material de recubrimiento de compuestos activos, tal es el caso de Ghasemi et al. (2017) y Tamm et al. (2016) que desarrollaron complejos con pectina y otros biopolímeros para incorporar compuestos activos lipofílicos, observando que las propiedades que aporta la pectina en la formación de complejos, mantiene los compuestos activos estables.

No obstante, compuestos activos de mayor interés para la encapsulación, por su alta inestabilidad, son los polifenoles (Chevalier et al., 2019; Faridi et al., 2017), por lo que los estudios se han enfocado en los complejos que se forman entre pectina y compuestos fenólicos derivados de extractos de plantas, así como el efecto que tiene el uso de algunas proteínas en la formación de los complejos proteína-polifenol-pectina, ya que han dado como resultado, mejores características y una mayor estabilidad de los polifenoles, en comparación con complejos que carecían de proteína; esto debido a que la proteína interacciona directamente con los polifenoles (Foegeding et al., 2018; Thongkaew et al., 2014), mientras que la pectina contribuye a su protección (Faridi et al., 2017) y de esta manera se pueden tener complejos estables, lo que permite su fácil incorporación en matrices alimentarias.

3.3 Polifenoles

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen un grupo fenol. A partir de estos se conforman los polifenoles, un grupo de numerosos metabolitos secundarios de las plantas, caracterizados por la presencia de una o más unidades de fenol (Pace et al., 2014). Estos compuestos en las plantas tienen funciones de protección al formar parte de los mecanismos de defensa ante el ataque de patógenos/depredadores o condiciones de estrés ambiental, además de que pueden contribuir a la pigmentación (Petti & Scully, 2009). El consumo de estos compuestos como parte de la alimentación, pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades debido a que pueden proporcionar diversos efectos benéficos al consumirlos por su actividad antioxidante, antiinflamatoria, etc. (Gómez et al., 2012).

3.3.1 Potencial biológico de los polifenoles

Las principales actividades biológicas de los compuestos fenólicos son: su actividad antioxidante, antiinflamatoria, anti-agregante plaquetario, antimicrobiana y antitumoral (Martínez et al., 2014); siendo la actividad antioxidante la más conocida, y que varía desde leve hasta muy fuerte dependiendo del tipo de compuestos fenólico.

El modo de acción antioxidante puede estar relacionado con una o más de las siguientes funciones: captadores de radicales libres, agentes reductores o formación de complejos con metales prooxidantes (Olguín et al., 2004). En donde el tipo de compuesto, el grado de metoxilación y número de grupos hidroxilo, son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante (Valls, 2003).

3.3.2 Estabilidad y biodisponibilidad

Los compuestos fenólicos, una vez que son extraídos, muestran inestabilidad al exponerse al calor, al ácido, al oxígeno y a la luz del día (Aceval et al., 2016). Estos problemas conducen a desafíos tecnológicos para su incorporación en el desarrollo de nuevos productos (Manach et al., 2004).

Una vez que se ingieren, durante su paso por tracto digestivo enfrentan la posibilidad de asociarse a la fibra dietética, a través de interacciones no-covalentes, disminuyendo su biodisponibilidad, esto como consecuencia del pH, la temperatura y la fuerza iónica del

ambiente en el que se encuentren (Jakobek & Matić, 2018), por lo que es necesario buscar alternativas de protección para favorecer su biodisponibilidad y puedan ejercer su funcionalidad en el organismo (Quiñones et al., 2012; Tomás-Barberan, 2003). Una opción es la utilización de cubiertas o matrices que los proteja durante la digestión, a través de la encapsulación.

3.3.3 Métodos de protección

En la mayoría de los casos los métodos de protección de los compuestos fenólicos se basan en la encapsulación de estos (Figura 6) (Aguiar et al., 2016; Ye et al., 2018). En este sentido, la microencapsulación es una técnica que puede superar los desafíos a los que se enfrentan los polifenoles, ya que pueden protegerlos una vez ingeridos; permitir una liberación controlada y dirigida; preservar su estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento; prevenir interacciones indeseables con otros compuestos; ralentizar los procesos de degradación; todo lo anterior manteniendo su funcionalidad (Aguiar et al., 2016).

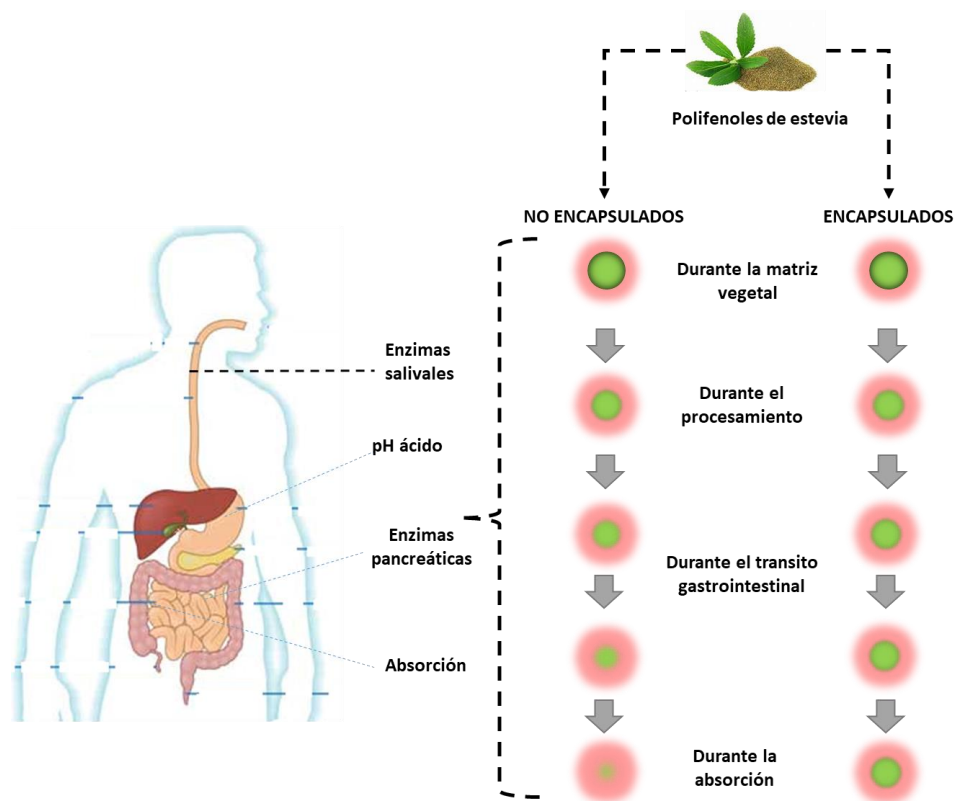


Figura 6. Funcionalidad de polifenoles en el organismo.

Fuente Elaboración propia

3.3.3.1 Encapsulación de polifenoles por secado por aspersión

El secado por aspersión representa la primera opción para la formación de microcápsulas, por lo que actualmente se considera una de las técnicas más estudiadas a nivel laboratorio y en escalamiento. En este sentido, existen reportes de sistemas que se han utilizado para encapsular polifenoles usando el secado por aspersión, los cuales se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos de sistemas de encapsulación de polifenoles

| Fuente de polifenol | Material de pared | Condiciones de secado | Referencia |
|---------------------------|---|---|----------------------------|
| Uva | Ácido palmítico + Quitosano (bicapa) | Flujo de aire = 0.6m ³ /min Presión = 0.5-2 kgf/cm ² Temperatura entrada = 80-140°C | (Taguchi et al., 2015) |
| Uva | Maltodextrina + goma arábica | Alimentación = 12 mL/min Flujo de aire = 35m ³ /h Temperatura entrada = 120-180°C | (Tolun et al., 2016) |
| Mora | Maltodextrina | Flujo de aire = 35m ³ /h Temperatura entrada = 150°C Temperatura salida = 80°C | (Fang & Bhandari, 2011) |
| Arroz Artemide | Maltodextrina + goma arábica | Alimentación = 7 mL/min Flujo de aire = 40 m ³ /h Temperatura entrada = 150°C | (Azzurra et al., 2018) |
| Orujo de oliva (aceituna) | Maltodextrina | Alimentación = 5-10 mL/min Flujo de aire = 20-32 m ³ /h Temperatura entrada = 130-160°C | (Aliakbarian et al., 2018) |
| Aceite de pescado | Caseinato de sodio + Goma arábica + extracto salvia | Alimentación = 15-22 g/min Temperatura entrada = 160°C Temperatura salida = 80°C | (Binsi et al., 2017) |
| Ácido galico | Matodextrina y goma arábica | Alimentación = 80-120 mL/min Flujo de aire = 28 m ³ /h Temperatura entrada = 85-105°C | (Ramírez et al., 2015) |

3.4 Estevia

La planta de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es un pequeño arbusto perenne originario de Sudamérica perteneciente a la familia *Asteraceae*; crece principalmente en la cordillera de Amambay en Paraguay, y debido a sus elevadas propiedades edulcorantes y su bajísimo contenido calórico, su consumo se ha extendido a otros países, como Canadá, Estados Unidos, China, Japón y algunas partes de Europa (González-Moralejo, 2011; Bursac et al., 2018).

Se han encontrado más de 200 especies de este género, pero solo las especies *S. rebaudiana* y *S. phlebophylla* tienen la capacidad de endulzar debido a que producen en sus hojas edulcorantes de naturaleza diterpénica. *S. rebaudiana* produce glucósidos de esteviol (Bursac et al., 2018), que son los compuestos responsables del poder edulcorante de la planta, proporcionándole un dulzor 300 veces más potente que la sacarosa normal pero con menor valor calórico (2.7 kcal/g) (Salvador-Reyes et al., 2014; Šic et al., 2013); de ahí que estos compuestos, conocidos como esteviósidos, actualmente son utilizados como sustituto del azúcar de mesa para endulzar bebidas y otros alimentos. Los edulcorantes producidos por *S. phlebophylla*, también son diterpenos ent-kauranos, sin embargo, no son esteviósidos (Ceunen & Geuns, 2013).

Varios reportes han evidenciado el efecto biológico de la estevia, el cual está proporcionado por diversos compuestos bioactivos, los cuales, según López-Díaz et al., 2014, se encuentran principalmente en las hojas de la planta en porcentajes variables según la especie y condiciones de cultivo; entre estos compuestos destacan: los glucósidos de esteviol y fitoquímicos, como los flavonoides (flavonoles y flavonas) (Góngora et al., 2018), una cantidad importante de compuestos antioxidantes (vitamina C, polifenoles, clorofilas y carotenoides) y compuestos como el ácido fólico, algunos aminoácidos y minerales (Koubaa et al., 2015; Šic et al., 2013). Sin embargo; los dos principales grupos de fitoquímicos de las hojas de estevia son los glucósidos de esteviol y fenoles.

3.4.1 Esteviósidos

Los esteviósidos o glucósidos de esteviol son glucósidos diterpénicos (Tabla 5) cuya molécula principal es el esteviol, en el cual el átomo de hidrógeno del grupo carboxilo ha sido reemplazado por una molécula de glucosa para formar un éster y un hidrógeno hidroxílico ha sido reemplazado con combinaciones de glucosa y ramnosa para formar un acetal (Figura 7).

De acuerdo a su estructura estos compuestos se clasifican en: esteviósido, rebaudiósidos A, B, C, D y E, dulcósido A y esteviolbiósido (Duran et al., 2012).

Tabla 5. Composición de glucósidos de esteviol en hojas de estevia deshidratada

| Tipo de glucósido | (Bursac et al., 2018) | (Brandle et al., 1998) |
|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Esteviósido | 4-13% | 9.1% |
| Rebaudiósido A | 2-4% | 3.8% |
| Rebaudiósido C | 1-2% | 0.6% |
| Dulcósido A | 0.4-0.7% | 0.3% |
| Rebaudiósido B | Trazas | Trazas |
| Rebaudiósido D | Trazas | Trazas |
| Rebaudiósido E | Trazas | Trazas |

Como se observa en la Tabla 5, los más abundantes son el esteviósido y el rebaudiósido A y son los responsables parciales del gusto amargo después de la ingesta, aunque la contribución del rebaudiósido A es significativamente menor que la del esteviósido. De estos glucósidos, el rebaudiósido A es el más dulce y el más estable, además de ser el menos amargo; de hecho, el primero es conocido por su dulzor alrededor de 200-300 veces más dulce que la sacarosa, mientras que el segundo es más soluble y da un sabor que es más similar a la sacarosa (Bursac et al., 2018).

Se ha reportado que los glucósidos de esteviol presentes en extractos de *S. rebaudiana* tienen efectos benéficos al consumirlos, por ejemplo, Anton et al., (2010) reportaron que el esteviósido reduce el exceso de glucosa en el torrente sanguíneo y regula los niveles de insulina lo que sugiere su uso como ingrediente en la prevención y el tratamiento de la diabetes, otros estudios reportan su efecto en la reducción de la presión arterial y sugieren su uso para saciar el apetito y sustituir a la sacarosa (Duran et al., 2012).

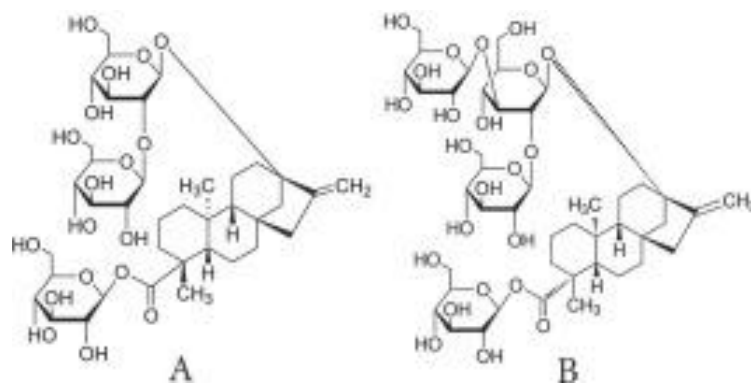


Figura 7. Principales glucósidos de estevia, A) esteviósido y B) rebaudiósido A.
Fuente: Bursac et al. (2018).

3.4.2 Compuestos fenólicos

Se ha reportado que las hojas de estevia tienen una alta concentración de compuestos fenólicos (Tabla 6). De estos compuestos se han identificado diversas clases en extractos metanólicos (agua:metanol 50%) de hojas de estevia, entre los que destacan: (i) ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, ácido protocatecúico), (ii) ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido cumárico) y (iii) flavonoides (catequina, epicatequina, rutina, quercetina y apigenina) (Bursac et al., 2018).

Tabla 6. Composición de compuestos fenólicos en estevia

| Parte de la planta | Fenoles totales mg/g | Flavonoides totales mg/g | Referencia |
|--------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Hojas | 24.01 | 19.93 | Abou-Arab et al. (2010) |
| Hojas | 25.18 | 21.73 | Bursac et al. (2018) |
| Callos | 35.86 | 31.99 | Bursac et al. (2018) |
| Extracto | 56-61 mg/g extracto | - | Shukla et al. (2009) |

También se ha reportado en hojas de estevia la presencia de carotenoides (30.50 mg/100 g b.s.) y clorofilas (77.40 mg y 46.39 mg/100 g b.s. para la clorofila a y b respectivamente) (Abou-Arab et al., 2010). Mientras que Gasmalla et al. (2014) reportan que las hojas de *Stevia* contienen en promedio 5.43-5.91 g/100 g de taninos.

3.4.3 Extracción de compuestos bioactivos de la estevia

La planta de estevia puede usarse como hojas enteras o trituradas, sin embargo, han sido mucho más estudiados las propiedades y compuestos que proporciona esta planta a través de sus extractos acuosos o etanólicos, ya sea líquidos o en polvo (Figura 8).

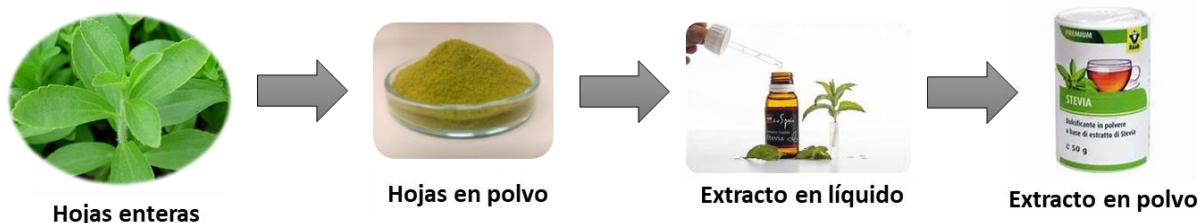


Figura 8. Presentaciones de uso de la estevia

Para extraer los compuestos bioactivos de las hojas de estevia se ha reportado tanto técnicas convencionales como más modernas (Tabla 7), comprobando que estas últimas proporcionan una mayor eficiencia en la extracción, menor consumo de energía, mayor rendimiento, mejor control de la temperatura y extractos de mayor calidad (Bursac et al., 2018); sin embargo, la desventaja de estas técnicas emergentes es que aún se encuentran en estudio a nivel laboratorio. Es por eso que el uso de las técnicas clásicas de extracción (convencionales) basadas en la maceración y la extracción con calor, en comparación con las técnicas de extracción innovadoras, representan una de las primeras opciones para obtener extractos de estevia debido a que son un método de bajo costo y fácil acceso.

3.4.3.1 Extracción convencional

La extracción convencional de compuestos bioactivos de estevia incluye técnicas como la infusión, maceración, decocción, extracción con solventes, extracción soxhlet e hidrodestilación

(Ameer, Chun, & Kwon, 2017); basándose principalmente en un efecto térmico ayudado por la agitación de materia prima de estevia, que posteriormente es retirada del solvente para finalmente concentrar el extracto, y almacenarlo para su uso.

Tabla 7. Métodos de extracción de compuestos bioactivos de estevia

| Método de extracción | Tipos de compuesto bioactivos | Referencia |
|--|--|---|
| Extracción asistida por microondas | Compuestos con potencial antimicrobiano, polifenoles | (Ciulu et al., 2017; Pina-Pérez et al., 2018) |
| Extracción asistida por campos eléctricos pulsados | Potencial antimicrobiano, polifenoles | (Barba et al., 2015; Pina-Pérez et al., 2018) |
| Extracción líquida presurizada | Polifenoles | (Ciulu et al., 2017) |
| Extracción acelerada por solventes | Glucósidos (esteviósido y rebaudiosido A) | (Jentzer et al., 2015) |
| Extracción de fluidos supercríticos | Polifenoles, esteviósido y rebaudiosido A | (Ameer et al., 2017) |
| Ultrasonidos de alta intensidad | Glucósidos de esteviol, polifenoles | (Barba et al., 2015; Kujundžič et al., 2017) |
| Extracción con plasma atmosférico gaseoso | Glucósidos de esteviol | (Kujundžič et al., 2017) |
| Extracción asistida por enzimas | Esteviósido | (Puri et al., 2012) |

Los extractos de estevia se pueden obtener usando como solventes agua o alcohol calientes, o una mezcla de ambos; y, en algunos casos se utilizan solventes no polares como el cloroformo, hexano entre otros (Barba et al., 2015). No obstante, tanto los polifenoles como los glucósidos de esteviol (compuestos bioactivos de estevia) son solubles en agua, por lo que un extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* puede conservar las propiedades de dichos compuestos (Barba et al., 2014). Es por lo que a pesar de los nuevos métodos para obtener compuestos bioactivos de

estevia la extracción convencional de extractos acuosos de esta planta sigue siendo una de las opciones más económicas y sencillas para la obtención de sus componentes bioactivos.

3.4.4 Usos y aplicaciones de la estevia.

Debido a la variada cantidad de compuestos bioactivos con los que cuentan las hojas de estevia, y a la facilidad con la que se extraen, esta planta se considera que proporciona diversos efectos benéficos a la salud (Aceval et al., 2016); sin embargo, el principal uso por el que se conoce a esta planta es por su poder edulcorante (Mayan Sweet, 2018), seguido del su efecto antioxidante.

El poder edulcorante de la estevia es debido a los glucósidos de esteviol presentes en la planta, y que le confiere un uso como un edulcorante alternativo en comparación con la sacarosa, de hecho, comercialmente se elaboran endulzantes con extractos de estevia para su uso como ingrediente alimentario. Además, debido a la excelente estabilidad ante la temperatura y el pH (Kroyer, 1999), se pueden incluir en los alimentos y bebidas, que durante su elaboración son sometidos a estas condiciones; un ejemplo son los productos de panificación.

En cuanto al uso que se le da a la estevia por sus propiedades antioxidantes, existen reportes de que el efecto antioxidante de la estevia es atribuido principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y, en menor medida, a algunos glucósidos como el rebaudiósido A (Góngora Salazar et al., 2018). De hecho existen reportes de que el extracto etanólico de estevia proporciona buenas propiedades antioxidantes y efectos antiproliferativos en comparación con el esteviósido por si solo (López et al., 2016), debido a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en él. Sin embargo, debido a la poca estabilidad de estos compuestos, los usos y aplicaciones sobre los polifenoles de estevia aún se encuentran en estudio.

4. Justificación

Los problemas fitosanitarios y ambientales que ocasionan los desechos de residuos agroindustriales de cítricos han cobrado gran importancia en los últimos años debido a que pueden ser utilizados para la obtención de ingredientes para la industria alimentaria, como es el caso de la pectina.

La pectina, es un polisacárido usado en la industria de alimentos como adyuvante tecnofuncional por sus propiedades gelificantes, emulsificantes, estabilizantes y, recientemente, para la liberación controlada de compuestos en alimentos.

Estas pectinas se pueden emplear para la encapsulación de compuestos bioactivos como los polifenoles con la finalidad de protegerlos para que conserven la actividad antimicrobiana y antioxidante que poseen, ya que son altamente inestables al ser extraídos de sus fuentes naturales, y pueden degradarse durante su procesamiento y almacenamiento debido al efecto de diferentes condiciones ambientales (humedad, pH, temperatura, luz, oxígeno).

En la actualidad, el requerimiento de ingredientes con funcionalidad tecnológica, nutrimental y capacidad para actuar como promotores de la salud conlleva al estudio de fitoquímicos de fuentes naturales en sustitución de compuestos activos de origen sintético; un ejemplo de esto son los encontrados en los extractos acuosos de estevia, que proporcionan efectos benéficos al consumirlos debido a su potencial antioxidante y antimicrobiano. Adicional a estas ventajas, los extractos de estevia son una fuente de edulcorantes no calóricos, es decir, no altera los niveles post prandiales de glucosa en la sangre, disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas. Debido a estas ventajas que proporcionan los compuestos bioactivos de los extractos de estevia en la salud humana, se ha comenzado a utilizar en forma de polvos (deshidratados) para la elaboración de algunos alimentos. Sin embargo, cuando estos extractos son deshidratados para convertirlos en polvo, presentan inconvenientes durante las condiciones de almacenamiento y consumo, ya que tienden a ser muy higroscópicos y se oxidan con facilidad, lo que inhibe su funcionalidad.

En este sentido, una alternativa atractiva es el empleo de residuos agroindustriales de toronja y mandarina, como fuente natural de pectinas con potencial biológico, funcional y estructural que, en combinación con otros biopolímeros pueden ser utilizados para desarrollar matrices a base de carbohidratos complejos y moléculas con composición biológica activa como las encontradas

en extractos acuosos de estevia (polifenoles principalmente), para potenciar el empleo de ambas biomoléculas como ingredientes en el desarrollo de nuevos productos alimentarios de valor agregado. El obtener pectinas de residuos cítricos para garantizar la efectividad de los compuestos bioactivos de estevia en el organismo, se considera un opción viable para da valor agregado a los subproductos de la agroindustria cítrica, que tan solo en Yucatán, la toronja y mandarina representan una cantidad considerable de residuos una vez que los frutos son procesados, y de los cuales, existen escasos reportes de su utilización para la extracción de pectina en comparación con los residuos de limón y la naranja, que son los cítricos más estudiados y explotados.

Por lo anterior, la sinergia e interacción de la pectina y otras biomoléculas con los compuestos bioactivos polifenolicos de la estevia, utilizando técnicas seguras y eficientes como el secado por aspersión, podría potencializar el desarrollo nuevos ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales innovadores.

5. Hipótesis

El empleo de pectinas cítricas de alto metoxilo de *Citrus paradisi* y *Citrus reticulata* obtenidas de residuos agroindustriales, y su uso en la construcción de matrices poliméricas estables de grado alimentario favorecerá la encapsulación, protección y estabilidad de diferentes moléculas biofuncionales presentes en extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* Bertoni a través del tiempo.

6. Objetivos

6.1 General

Evaluar la efectividad de pectinas de *Citrus paradisi* y *Citrus reticulata* como agentes encapsulantes de los compuestos bioactivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

6.2 Específicos

1. Evaluar las propiedades fisicoquímicas de las pectinas de *Citrus paradisi* y *Citrus reticulata* obtenidas a través de un método asistido por ultrasonido.
2. Evaluar mediante pruebas *in vitro* la actividad antioxidante de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* Bertoni.
3. Desarrollar y estandarizar el proceso de encapsulación para extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediante el empleo de pectinas de *Citrus paradisi* y *Citrus reticulata* utilizando el secado por aspersión.
4. Evaluar las propiedades físicas, la morfología y el tamaño de partícula de las microcápsulas formadas con pectinas cítricas a través del secado por aspersión.

7. Metodología

7.1 Materias primas

7.1.1 Harinas cítricas

Los residuos de toronja (*Citrus paradisi* variedad Star Ruby) y mandarina (*Citrus reticulata* blanco variedad Tangerina) se obtuvieron en la planta piloto del CIATEJ, A.C. Sede Sureste como parte del proyecto: “Establecimiento a nivel piloto de un proceso para la obtención de extractos bioactivos de subproductos de cítricos”. El proceso y condiciones se ejemplifica en la Figura 9.

Los cítricos provinieron del municipio de Oxkutzcab, Yucatán, México. Se seleccionaron los frutos que no presentaban signos de daño físico para ser lavados y desinfectados usando detergente neutro extran Merck (MA-02); se realizó la extracción del jugo de manera manual con ayuda de un exprimidor eléctrico, y se trabajó únicamente con el residuo sólido (cáscaras, vesículas de jugo y semillas). Posteriormente, los residuos se molieron para reducir y homogeneizar su tamaño utilizando un procesador HOBART con cuchillas 1/16 y 3/8 para la toronja y mandarina, respectivamente. Finalmente, se deshidrataron en un secador de charolas a 50°C hasta obtener una humedad promedio <10%.

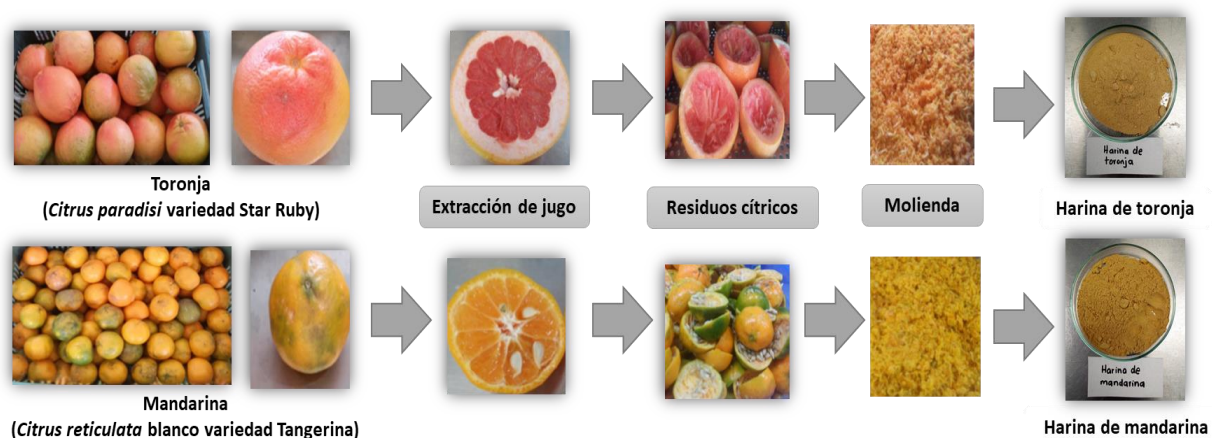


Figura 9. Proceso de obtención de harinas cítricas. Fuente: Elaboración propia con imágenes de Gonzalez-Flores (2016).

7.1.2 Harina de estevia

Las hojas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) se obtuvieron de la empresa Intensivo S.A. de C.V., secadas en un deshidratador de charolas marca JERSA y molidas en un molono PULVEX, ubicados en la planta piloto del CIATEJ, A.C. Sede Sureste. El proceso y condiciones seguidas para obtener la estevia en polvo se ilustra en la Figura 10. Se utilizaron únicamente las hojas de la planta, las cuales fueron seleccionadas para su posterior secado a 50°C en un secador de charolas marca JERSA; y finalmente molidas hasta la obtención del polvo.



Figura 10. Proceso de obtención de harinas de estevia. Fuente: Elaboración propia

7.2 Caracterización de materias primas

Las harinas cítricas fueron sometidas a un análisis fisicoquímico para conocer su composición. Para esto las harinas fueron tamizadas hasta obtener un tamaño de partícula $<0.3\mu\text{m}$ y se mantuvieron en refrigeración a -2°C ; antes de utilizarlas se mantuvieron a temperatura ambiente por 48 h con el fin utilizarlas bajo condiciones de trabajo de laboratorio. Con el mismo fin se determinó el contenido de humedad, actividad de agua, el color, pH y cenizas de las harinas de estevia.

7.2.1 Determinación del contenido de humedad

Se realizó con base a la metodología descrita en la NMX-F-428-1982, utilizando una termobalanza Ohaus (MB45). Los resultados se expresaron en porcentaje.

7.2.2 Determinación de cenizas

Se utilizó la técnica de diferencia de peso descrita en la NMX-F-607-NORMEX-2013. Las muestras (0.5-1 g) fueron carbonizadas antes de ser llevadas a calcinación, se utilizó una mufla Felisa (FE-363) a 550°C durante 5 horas. Se utilizó la Ecuación 1 para calcular el porcentaje de cenizas totales en la muestra.

$$\% \text{ cenizas totales} = \frac{P.\text{crisol con cenizas} - P.\text{crisol tarado}}{P.\text{ muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

7.2.3 Determinación de grasas

Se utilizó el método de extracción Soxhlet (AOAC, 2000). El sistema se montó en un equipo Scorpion-Scientific (A50-270). Las muestras se colocaron en un dedal de papel filtro dentro del extractor, se utilizó éter etílico como solvente de extracción. Se calentó el solvente en un matraz de balón (previamente tarado) hasta que la extracción generó 10 reflujos en el sistema. Una vez terminado el proceso, el solvente fue recuperado y los matraces secados y pesados. Se calculó el contenido de grasas en cada muestra con ayuda de la Ecuación 2.

$$\% \text{ grasas} = \frac{P.\text{matraz con grasa} - P.\text{matraz tarado}}{P.\text{ muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

7.2.4 Determinación de proteínas

Se implementó el método Kjeldahl para determinar el contenido de nitrógeno en un equipo VELP-Scientifica (UDK-129). En los tubos se pesó de 0.5 a 1.5 g de muestra, 2 pastillas del catalizador compuesto por $\text{CuSO}_4\text{-K}_2\text{SO}_4$ y 13 mL de H_2SO_4 , la digestión se realizó a 420° C por 60 min. La destilación se realizó con 30 mL de H_3BO_3 al 4%, 75 mL de NaOH al 32% y 50 mL de dH_2O . Las muestras se titularon con solución patrón de HCl 0.1 M agregando 2 gotas del indicador mixto Shiro-Tashiro. Se determinó el contenido de nitrógeno, y se utilizó el factor 6.25 para calcular el % de proteína en cada muestra (NMX-F-068-S-1980).

$$\% N = \frac{\text{mL gast HCl} * N \text{ del HCl} * 0.014}{\text{g muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

$$\% \text{ Proteína} = (\% N)(\text{Factor}) \quad \text{Ec. 4}$$

7.2.5 Determinación de fibra cruda

Para esta determinación se utilizó la técnica descrita en la norma NMX-F-090-S-1978 adaptándose a las condiciones de un equipo Fibertec™ (FOSS FT-121, FOSS FT-122). Las muestras (0.5-1 g) se colocaron en crisoles FOSS secos y tarados con 0.5 g de celita. Los crisoles se colocaron en el equipo, en donde se realizó la digestión ácida con H₂SO₄ al 1.25%, seguida de un tratamiento con NaOH al 1.25%. Posteriormente, se realizó una calcinación para determinar el contenido de fibra cruda en la muestra tal y como se muestra en la Ecuación 5.

$$\% \text{ fibra cruda} = \frac{P.\text{crisol residuo} - P.\text{crisol residuo tarado}}{P.\text{ muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

7.2.6 Determinación de Extracto Libre de Nitrógeno ELN (carbohidratos totales)

Se realizó el cálculo por diferencia del resto de macronutrientes (%Humedad, %Ceniza, %Grasas, %Proteínas, %Fibra) tomando como base un total del 100% (Siqueira et al., 2017).

7.2.7 Determinación de acidez titulable

Se realizó de acuerdo con la metodología de la AOAC 935.57, para ello se filtró una solución de la harina 1:20 (p/v) con H₂O. El filtrado se tituló en agitación constante con una solución de NaOH 0.1 M en presencia de fenolftaleína al 1% como indicador. El resultado se expresó como porcentaje de ácido cítrico con ayuda de la Ecuación 6.

$$\% \text{ acidez} \left(\frac{\text{g ac.cítrico}}{100 \text{ mL}} \right) = \frac{V.\text{gast.NaOH} * M \text{ NaOH} * F.\text{ac.cítrico} * F.\text{dilución}}{\text{g muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

7.2.8 Determinación de pH

Para esta determinación se empleó un potenciómetro HANNA-Instruments (HI-3222) previamente calibrado con soluciones buffer pH = 1.68, 4, 7 y 10. Se preparó una dilución 1:25 (p/v) de cada harina con agua destilada.

7.2.9 Determinación de actividad de agua

Se determinó a 25°C con la ayuda de un medidor de actividad de agua NOVASINA (LabSwift-a_w) calibrado con soluciones de a_w conocida.

7.2.10 Determinación del color

Se utilizó un colorímetro MINISCAN EZ HUNTERLAB (4500L) para determinar las coordenadas de color siguiendo el modelo CIElab; L* (negro/blanco), a* (verde/rojo) y b* (azul/amarillo); y a partir de estos, calcular c* (croma) y h° (ángulo de tono) (Ecuación 6 y 7) (Montoya-López et al., 2012).

$$c^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ec. 7}$$

$$h^\circ = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad \text{Ec. 8}$$

7.3 Extracción de pectinas

Se utilizaron las harinas de toronja y mandarina previamente analizadas para extraer su pectina. Con el objetivo de evaluar el efecto que tienen distintos métodos en la extracción de pectina de un mismo cítrico, se utilizaron dos métodos: el método convencional y un método alternativo: extracción asistida por ultrasonido (EAU).

7.3.1 Extracción convencional (EC)

Se utilizó la metodología descrita por Jamsazzadeh et al. (2014) con algunas modificaciones. Se re-suspendió cada harina en proporción 1:30 (p/v) en una solución de ácido cítrico 0.1 N usando un volumen de extracción de 300 mL. El procedimiento consistió en elevar la temperatura del agua destilada (80/90°C) en una placa de calentamiento Thermo-Scientific (SP-131325);

enseguida se agregó el ácido cítrico agitando hasta su disolución y posteriormente la harina. La temperatura se mantuvo por 90 minutos en agitación constante.

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura en el rendimiento de extracción de pectina se realizaron extracciones a 80 y 90°C para cada una de las harinas.

7.3.2 Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)

Se utilizó el procedimiento reportado por Wang et al., (2016). Se utilizó un generador de ondas ultrasónicas Ultrasonic-Processor (GEX130PB) conectado a una sonda ultrasónica #422-A (CV188), que genera una potencia de 130 W y una frecuencia de 20 kHz. La extracción se realizó en proporción 1:50 (p/v) con cada una de las harinas en agua destilada usando un volumen de extracción de 100 mL. El procedimiento consistió en ajustar el pH del agua a 2.5 con ácido cítrico 1 M (aproximadamente 7 mL de ácido); se elevó la temperatura del agua (80°C) en una placa de calentamiento Thermo-Scientific (SP-131325) antes de ser colocada la sonda.

Con el fin de evaluar el efecto de los factores manipulables durante la sonicación en la EAU, se utilizó un diseño factorial 3x2. Se evaluaron 2 tiempos de extracción (15 y 30 min) y 3 amplitudes de las ondas ultrasónicas (70, 80 y 90%), teniendo como variable de respuesta el rendimiento de extracción de pectina. La potencia y frecuencia utilizadas fueron 130 W y 20 kHz respectivamente, mientras que la temperatura de extracción se mantuvo a 80°C, y se controló con pulsos de 5 min de sonicación y 2 min de reposo.

7.3.3 Recuperación de la pectina

En ambos métodos, una vez terminada la extracción, se procedió a recuperar la pectina del medio de extracción. Para esto, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, para posteriormente separar la harina en una centrifuga refrigerada Thermo-Scientific (SL40R) a 4500 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se mezcló con etanol 96° en proporción 1:1 (v/v) y se dejó que la pectina precipitara por 16 hrs a 4°C. La pectina se recuperó centrifugando la mezcla a 4500 rpm durante 30 min a 4°C. Para eliminar impurezas de la pectina se procedió a lavarla con etanol 96° (3 lavados consecutivos) (Devia, 2003). Posteriormente, la pectina fue secada en horno de convección Thermo-Scientific (Heratherm) a 40°C por 8 horas. Finalmente se redujo el tamaño de partícula con ayuda de un molino Krups (GX-4100-11V), y se almacenó a temperatura ambiente en un desecador.

7.3.4 Rendimiento de extracción (%Rend)

El rendimiento de extracción de pectina expresado en porcentaje (% Rend), fue calculado tal y como lo describe Cuevas-Bernardino et al. (2016) con ayuda de la Ecuación 9.

$$\% \text{ Rend} = \frac{\text{Peso pectina}}{\text{Peso de harina}} \times 100 \quad \text{Ec. 9}$$

7.3.5 Rendimiento total de extracción (%T-Rend): Segunda extracción

Con el fin extraer la mayor cantidad de pectina disponible en la harina e incrementar el rendimiento de extracción en ambos métodos, se procedió a realizar dos extracciones consecutivas a la misma muestra de harina tal y como lo describe (Wang et al., 2015). La suma de estas dos extracciones en cada una de las pectinas fue considerada como el rendimiento total de extracción (%T-Rend) tal y como se observa en la Figura 11.

Para esto, se seleccionaron los tratamientos que arrojaron los mayores %Rend en ambos cítricos y en ambos métodos. En la EC, un volumen similar de dH₂O fue precalentado y mezclado con la harina recuperada en la centrifugación; la extracción se mantuvo 80°C por 90 minutos. Mientras que en la EAU un volumen similar de dH₂O fue precalentado hasta llegar a la temperatura de extracción, y posteriormente la harina recuperada fue re-suspendida para sonicarse por el mismo tiempo y amplitud bajo las condiciones usadas inicialmente.

Adicional a esto, se determinó la cantidad total de pectina disponible (%Pec-T) en las harinas cítricas mediante extracciones continuas a la misma muestra de harina hasta que no tuvieran restos de pectina, lo cual se corroboró al no haber precipitación al momento de agregar etanol a la mezcla con pectina solubilizada.

7.4 Caracterización de pectinas

Las pectinas (toronja y mandarina) seleccionadas para realizar el análisis físicoquímico, propiedades funcionales y estructurales fueron las del mejor tratamiento obtenido por el método convencional y el método por ultrasonido. Todos los análisis se compararon con una pectina cítrica comercial SIGMA-ALDRICH (CAS=9000-69-5) que fue usada como control. Se utilizó la siguiente codificación para identificar las muestras:

- PC = Pectina comercial
 PTC = Pectina de Toronja método Convencional
 PMC = Pectina de Mandarina método Convencional
 PTU = Pectina de Toronja método Ultrasonido
 PMU = Pectina de Mandarina método Ultrasonido

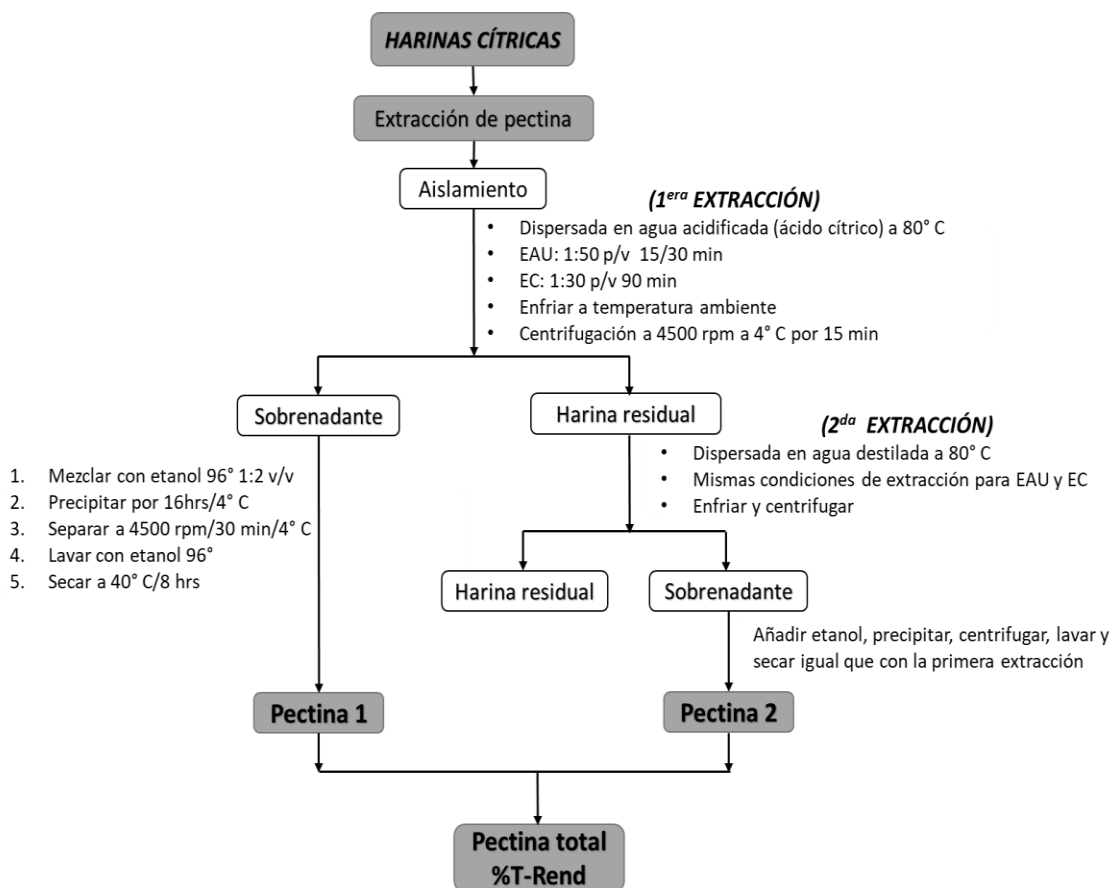


Figura 11. Esquema de extracción de pectina %T-Rend

7.4.1 Análisis fisicoquímicos

Para la determinación del % humedad, % cenizas y % de proteína, así como la actividad de agua (A_w), el pH y el color se utilizaron los procedimientos previamente descritos en el apartado 7.2.

7.4.1.1 Azúcares totales

Se utilizó la metodología del fenol-sulfúrico propuesta por Dubois et al. (1956). Se preparó una solución de cada pectina disolviendo 20 mg en 50 mL de agua destilada. 200 μ L de cada muestra se hicieron reaccionar con 200 μ L de fenol al 5%, enseguida se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (de forma rápida sin dejar que el ácido resbalara por las paredes); las muestras fueron agitadas con ayuda de un vortex y se dejaron reposar por 10 minutos; posteriormente se colocaron las muestras en un baño de agua a 30°C por 15 minutos. Se determinó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro UV-Visible Jenway (6715) a una longitud de onda de 490 nm. Para los cálculos se utilizó una curva de calibración de 10-80 μ g/mL de glucosa a partir de una solución patrón de 100 mg/L, el blanco se realizó con agua destilada.

7.4.1.2 Determinación de acidez libre

Se siguió la metodología utilizada por Ayora-Talavera et al. (2016). Para ello, la solución previamente preparada para medir el pH (0.5% p/v) fue titulada con una solución de NaOH al 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador. Se expresaron los resultados en términos de miliequivalentes (mEq) de carboxilos libres por gramo de pectina.

$$\% \text{ acidez } \left(\frac{\text{mEq ac. carboxílicos}}{\text{g pectina}} \right) = \frac{V. \text{ gast. NaOH} * N \text{ NaOH}}{g \text{ muestra}} \quad \text{Ec. 10}$$

7.4.2 Análisis de propiedades estructurales

7.4.2.1 Grado de esterificación (%GE)

Se preparó una solución de pectina disolviendo 100 mg en 20 mL de agua libre de CO₂, a la cual se le realizó un par de titulaciones potenciométricas; primero se tituló con NaOH 0.1 N en presencia de fenolftaleína al 1% hasta el vire de color; enseguida se adicionaron 20 mL de NaOH 0.1 N y se dejó agitando durante 2 horas a temperatura ambiente, al paso del tiempo se adicionaron 10 mL de HCl 0.1 N, para nuevamente repetir la titulación (Baltazar Flores et al., 2013; Bocek et al., 2001). El grado de esterificación (%GE) se expresó en porcentaje con ayuda de la siguiente Ecuación:

$$\% GE = \frac{V_2 \text{ gast NaOH}}{V_1 \text{ gast NaOH} + V_2 \text{ gast NaOH}} \times 100 \quad \text{Ec. 11}$$

7.4.2.2 Ácido galacturónico (%AcGal)

Se utilizó la metodología propuesta por Blumenkrantz y Asboe-Hansen, (1973). Se prepararon soluciones de pectina 20 mg/50 mL. A 200 μ L de muestra se le adicionaron 1.2 mL del reactivo de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.0125 M en H_2SO_4 en un baño de hielo, las muestras se llevaron a baño maría a 100° C durante 5 minutos y, una vez frías, se adicionaron 20 μ L del reactivo m-hidroxidifenil al 0.15% en NaOH 0.5%. La solución se agitó con ayuda de un vortex y se dejaron reposar por 5 min, finalmente se leyeron las muestras en un espectrofotómetro UV-Visible Jenway (6715) a una longitud de onda de 520 nm. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con un estándar de ácido galacturónico de 2.5 a 125 μ g/mL a partir de una solución patrón de 200 μ g/mL; se elaboró un blanco con 200 μ L de agua destilada sustituyendo el m-hidroxidifenil por NaOH 0.5N. El contenido de ácido galacturónico fue expresado en g de ácido por 100 g de pectina.

7.4.2.3 Viscosidad intrínseca $[\eta]$ y estimación del peso molecular viscosimétrico (PMol)

La determinación de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ se realizó de acuerdo con el procedimiento de Cuevas-Bernardino et al. (2016) con ligeras modificaciones. Se realizaron diluciones de pectina en agua desionizada (NaCl 100 mM) en un rango de 0.25-2 g/L, las diluciones se almacenaron durante 24 hrs en refrigeración para completar la hidratación. Antes de la medición de viscosidad, las muestras diluidas se agitaron en un vortex y se dejaron equilibrar por 15 minutos. La viscosidad se determinó con un reómetro TA-Instruments (Discovery HR-2) utilizando la geometría de cilindros concéntricos a una velocidad constante de 63.10 s^{-1} , y una temperatura de 30°C. Las viscosidades relativas (η_{rel}), específicas (η_{sp}) y reducidas (η_{red}) se calcularon a partir de las siguientes formulas:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_1}{\eta_0} \quad \text{Ec. 12}$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_1}{\eta_0 - 1} \quad \text{Ec. 13}$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_1}{\eta_0 - 1C} \quad \text{Ec. 14}$$

Donde: η_1 es la viscosidad de la solución de pectina (Pas), η_0 es la viscosidad del disolvente (solución de NaCl 100 mM) y C es la concentración de pectina.

La viscosidad intrínseca $[\eta]$ se calculó extrapolando linealmente la viscosidad reducida a concentración cero. Esta viscosidad se relaciona con el peso molecular [Mw] a través de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$\eta = K' [Mw]^\alpha \quad \text{Ec. 15}$$

donde k' y α son constantes que dependen de la temperatura, así como del sistema polímero-disolvente y corresponden a valores de 9.55×10^{-4} y 0.73 respectivamente (Migliori et al., 2010).

7.4.2.4 Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier

El análisis de Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) se realizó con ayuda de un espectrofotómetro FTIR Bruker (SENSOR II) (Posé et al., 2012). Se usó un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante, y se configuró el software OPUS 7.5 Build para obtener los espectros de las muestras con una resolución de 4 cm^{-1} y 25 scns en un intervalo de longitud de onda de 500-4000 cm^{-1} . Posteriormente se realizó una compensación por CO_2 atmosférico y una corrección del ángulo de inclinación del ATR de diamante usado. Las mediciones se expresaron en % de absorbancia.

7.4.3 Análisis de propiedades funcionales

7.4.3.1 Contenido de polifenoles totales (CPT)

Se utilizó el procedimiento reportado por Bermúdez-Ooria et al. (2018) con algunas modificaciones. Se disolvieron 100 mg de pectina en 50 mL de agua destilada, la extracción se llevó a cabo por 2 h a baño maría a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación constante; enseguida la solución fue centrifugada con el fin de precipitar material insoluble. El contenido de compuestos fenólicos se determinó usando un método modificado de la técnica de Folin (Folin & Ciocalteu, 1927) tal y como se describe en la sección 7.6.1.1.

7.4.3.2 Capacidad de retención de agua (CRAg)

Se siguió la metodología reportada por Bayar et al., (2017). En un tubo de centrifuga (previamente tarado) que contenía la muestra de pectina se añadió agua destilada hasta una concentración final del 1% (p/v). La suspensión obtenida se incubó por 1 h a temperatura ambiente, y cada 15 min se agito durante 5 seg. Posteriormente, la suspensión se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm a 4°C, utilizando una centrífuga refrigerada Thermo-Scientific (SL40R). El sobrenadante se retiró y el tubo se inclinó en un ángulo de 45° sobre un papel de filtro, y se mantuvo drenando durante 30 minutos. La CRAg fue estimada mediante la ecuación de Bayar et al. (2017), la cual fue readaptada de la siguiente manera:

$$CRAg = \frac{Pd - (Pt + M)}{M} \quad \text{Ec. 16}$$

Dónde: Pd = Peso del tubo después del drenado
Pt = Peso del tubo seco
M = Peso de la muestra

7.4.3.3 Capacidad de retención de aceite (CRAc)

Se realizó mediante la metodología de Ganet al. (2010). En un tubo de centrifuga (previamente tarado) se mezclaron las muestras de pectina con aceite vegetal (aceite de canola) en proporción 1:10 (p/v). La solución se mantuvo en agitación constante durante 5 horas a temperatura ambiente, enseguida se llevó a una centrífuga refrigerada Thermo-Scientific (SL40R) a 5000 rpm y a 4°C por 15 min. El aceite fue decantado inclinando el tubo en un ángulo de 45° sobre un papel de filtro durante 30 minutos. La CRAc fue estimada mediante la siguiente ecuación:

$$CRAc = \frac{Pd - (Pt + M)}{M} \quad \text{Ec. 17}$$

Dónde: Pd = Peso del tubo después del decantado
Pt = Peso del tubo seco
M = Peso de la muestra

7.4.3.4 Propiedades emulsificantes

La capacidad de emulsión (CEm) y la estabilidad de la emulsión (EEm) se llevaron a cabo según el método de Bayar et al. (2016). Para la CEm, 10 mL de solución de pectina al 2% (p/v) fueron mezclados con 5 mL de aceite vegetal (aceite de canola), posteriormente se homogeneizaron en vortex durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, las emulsiones se centrifugaron a 4600 g durante 5 min utilizando una centrífuga refrigerada Thermo-Scientific (SL40R). La CEm se expresó en %, y se calculó de la siguiente manera:

$$\% CEm = \frac{V_e}{V_t} \times 100 \quad \text{Ec. 18}$$

Dónde: V_e = Volumen de la capa de emulsión
 V_t = Volumen total del fluido

Para calcular la EEm las emulsiones se incubaron durante 30 minutos a 80°C, y se centrifugaron a 4600 g durante 5 min. El % de EEm se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% EEm = \frac{V_{es}}{V_e} \times 100 \quad \text{Ec. 19}$$

Dónde: V_{es} = Volumen de la capa de emulsión remanente
 V_e = Volumen de la capa de emulsión

7.4.3.5 Propiedades espumantes

Las propiedades de formación de espuma que incluyen la capacidad de espuma (CEs) y la estabilidad de la espuma (EEs) se evaluaron de acuerdo con el método descrito por Bayar et al. (2016). En un tubo cónico se colocaron 10mL de una solución de pectina al 2% (p/v) y se homogeneizaron en un vortex por 3 minutos a temperatura ambiente. La CEs se expresó como el porcentaje de volumen que aumenta justo después de la homogeneización tal y como lo establece la siguiente ecuación:

$$\% CEs = \frac{V_T - V_o}{V_o} \times 100 \quad \text{Ec. 20}$$

Dónde: VT = Volumen total de la solución después del homogeneizado
Vo = Volumen total de la solución antes del homogeneizado

La EEs se expresó como el % de volumen de espuma restante después de 30 min con respecto al volumen de espuma inicial:

$$\% EEs = \frac{Vt - Vo}{VT - Vo} \times 100 \quad \text{Ec. 21}$$

Dónde: VT = Volumen total de la solución después del homogeneizado
Vt = Volumen total de la solución después de 30 min
Vo = Volumen total de la solución antes del homogeneizado

7.4.3.6 Solubilidad

Se pesaron una cantidad determinada de pectina para preparar una solución al 0.5% (p/v) con agua desionizada (previamente la pectina fue humedecida con unas gotas de etanol al 95%). La solubilidad de las pectinas se evaluó cualitativamente en agua y solución alcalina siguiendo el método y los parámetros descriptivos reportados por Begum et al. (2014). Para obtener la fracción soluble en agua caliente, la solución de pectina fue calentada a 90°C durante 15 minutos; mientras que para la fracción soluble en álcali se añadió exactamente 1 mL de NaOH 1 N a 5 mL de solución de pectina preparada, se mezcló correctamente y se calentó a 90°C durante 15 minutos para observar los cambios en la solución.

7.4.4 Análisis reológico

7.4.4.1 Curvas de flujo de soluciones de pectina

El comportamiento del flujo de las soluciones de pectina se midió utilizando el método descrito por Cuevas-Bernardino et al. (2016); las soluciones fueron preparadas al 1 y 2% (p/v) usando agua destilada ajustada a pH 6. Las curvas de flujo de las muestras de pectina se obtuvieron con un reómetro TA-Instruments (Discovery HR-2) utilizando una geometría de platos paralelos a 25°C y a velocidades de corte entre 1 y 1000 s⁻¹.

7.4.4.2 Curvas de frecuencia de soluciones de pectina

Se realizaron curvas de frecuencia a 1% y 2% p/v. Se graficó G', G'', y tang contra la frecuencia.

7.5 Extracción de compuestos bioactivos de estevia

Se realizó un extracto acuoso a partir de la harina de estevia en relación 1:10 (p/v) con agua destilada. La extracción se llevó a cabo a 50°C durante 2 horas en oscuridad en una placa de calentamiento Thermo-Scientific (SP-131325). Una vez terminado el tiempo, el extracto fue llevado a centrifugación a 4°C, por 10 min a 4500 rpm con ayuda de un centrifuga refrigerada Thermo-Scientific (SL40R) para separar la harina residual del extracto, posteriormente el sobrenadante se filtró con papel Whatman No 4 (125 mm) con ayuda de vacío; el extracto que contenía los compuestos bioactivos de estevia se protegió de la luz y se almacenó en refrigeración a 7°C hasta su uso.

7.5.1 Separación cromatográfica del extracto de estevia

7.5.1.1 Primer método

Se realizó una separación cromatográfica del extracto acuoso de estevia utilizando un Cromatógrafo Flash de Purificación Automatizada y Avanzada Biotage System (Isolera One). Se cargaron en una columna Biotage de 30 g de SNAP C18, 5 mL del extracto; la elución se llevó a cabo a un caudal de 25 mL/min utilizando un gradiente 0.1% de ácido fórmico en agua ultra pura (A = H₂O:HCOOH 99.9%:0.1%) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B= MeCN:HCOOH 99.9%:0.1%). El gradiente se programó de la siguiente manera: 3 volúmenes de columna (VC) de 0% isocrático de B, 2 VC de 0-10% de B, 2 VC de 10-23 % de B, 1 VC de 23 % isocrático de B, 10.5 VC de 23-24% de B, 2 VC de 24-100% de B, 6 VC de 100-50% de B. El monitoreo del pico de absorción se realizó por detección UV a una longitud de onda de 290 nm. Se recuperaron fracciones de interés de 20 mL c/ y el disolvente de acetonitrilo se eliminó de las fracciones mediante evaporación rotatoria, posteriormente se agruparon en 3 fracciones que se sometieron a la determinación de antioxidantes y la identificación y cuantificación de los compuestos de polifenoles como se explicó en el apartado 7.6.1.1.

7.5.1.2 Segundo método

De la misma manera se obtuvo un grupo secundario de fracciones del extracto acuoso utilizando un gradiente distinto de solventes para la elución. Para ello, 5 mL del extracto de estevia fueron cargados en la columna SANP C18; la elución se llevó a cabo a un caudal de 25 mL/min utilizando un gradiente de agua ultra pura (A) y una mezcla de metanol:ac. acético (97:3 v/v) (B). El gradiente se programó a 3 volúmenes de columna (VC) a 90% isocrático de B, 1.4 VC

de 90-74% de B, 2.1 VC de 74-51% de B, 0.1 VC de 51% isocrático de B, 3.8 VC de 51-8% de B, 0.6 VC de 8% isocrático de B, 0.7 VC de 8-0% de B, 7.4 VC de 0% de B, 1.3 VC de 0-90% de B, 4 VC de 90% de B. El monitoreo del pico de absorción se realizó por detección UV a una longitud de onda de 210 y 280 nm. Se recuperaron fracciones de interés de 20 mL c/u y el disolvente de metanol se eliminó de las fracciones mediante evaporación rotatoria, después de lo cual las fracciones se sometieron a la determinación de antioxidantes y la identificación y cuantificación de los compuestos de polifenoles como se explicó en el apartado 7.6.1.1.

7.6 Caracterización del extracto de estevia

El extracto acuoso de estevia y las fracciones obtenidas en el cromatógrafo Flash fueron analizadas para determinar la cantidad de polifenoles y la su actividad antioxidante. Todos los análisis se realizaron en tubos ámbar de 3 mL los cuales fueron lavados y desinfectados tal y como se describe en el Anexo 2.

7.6.1 Determinación del Contenido de Polifenoles Totales (CPT)

7.6.1.1 Método espectrofotométrico

El contenido de compuestos fenólicos se determinó usando un método modificado de la técnica de Folin (Folin & Ciocalteu, 1927), que emplea la reducción de un complejo fosfowolframato-fosfomolibdato a productos azules por compuestos fenólicos. Brevemente, se colocó una alícuota de 20 μ L del extracto de estevia (previamente diluido) en donde se añadió el reactivo Folin-Ciocalteu 1 N (250 μ L) y se dejó reaccionar la mezcla durante 8 minutos. Se añadió 1.25 mL de carbonato de sodio al 7.5% y se mezcló bien para finalmente añadir 480 μ L de dH₂O. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min para ser leídas a una absorbancia de 760 nm usando un espectrofotómetro UV-visible Jenway (6715). Los resultados se expresaron como mEq de ácido gálico, usando una curva de calibración en el rango de 25-1000 ppm (Anexo 3).

7.6.1.2 Método cromatográfico

Se procedió a identificar los compuestos fenólicos presentes en el extracto y en las fracciones de estevia mediante un análisis UPLC-PDA. Para esto se llevaron las muestras a un Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiencia (UPLC) Waters (Acquity H) equipado con una bomba cuaternaria (UPQSM), de inyector automático (UPPDALTC) y detector de matriz de

fotodiodos PDA λ (UPPDALTC). El software Empower 3 versión 2010 se utilizó para la adquisición y el procesamiento de datos.

La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se llevó a cabo usando una columna Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 100 x 2.1 mm ID a temperatura ambiente, el caudal se mantuvo en 0.2 mL min^{-1} y el volumen de inyección se programó a 2 μL . La fase móvil consistió en la mezcla de dos disolventes: ácido fórmico 0.1% en agua ultrapura (A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (B). El gradiente se programó como se describe a continuación: 100% A (inicial 2.0 min), 90.0% A (2.0-4.0 min), 77.0% A (4.0-6.0 min), 77.0% A (6.0-7.0 min), 76.5% A (7.0 – 17.5 min), 0% A (17.5 – 18.0 min), 50 % A (18.0 – 24.0 min) y 100% A (24.0 - 30 min). El detector de fotodiodos se fijó a 290 nm con una resolución de 4.8 nm para la detección del analito. La cuantificación se realizó por medio de curvas estándar analíticas preparadas individualmente y mezclando estándares de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido elágico, diosmina y rutina a concentraciones de 1 a 100 ppm.

7.6.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los polifenoles

7.6.2.1 Método por ABTS

Se evaluó la reducción del radical activo ABTS \bullet siguiendo el método descrito por Re et al., (1999). Se preparó una solución de ABTS \bullet 2 mM disolviendo 10 mg del reactivo en 10 mL de buffer PBS pH 7.4 (preparado con 8.18 g de NaCl, 0.27 g de KH_2PO_4 , 1.42 g de Na_2HPO_4 y 0.15 g de KCl disueltos en 1 L de dH_2O), el radical se activó con 40 μL de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 70 mM y se dejó reposar por 16 h en oscuridad y a temperatura ambiente antes de su uso. La solución de ABTS \bullet fue ajustada a una absorbancia entre 0.7 y 0.8 ($\lambda=734$ nm) con buffer PBS, posteriormente se hicieron reaccionar 990 μL de esta solución con 10 μL de muestra dejando reposar por 6 min en oscuridad; la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro UV-visible Jenway (6715) a una $\lambda=734$ nm. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la ecuación 22; además los resultados se expresaron como $\mu\text{g/mL}$ de trolox usando una curva de calibración de 50-875 ppm de Trolox (Anexo 4), se utilizó buffer PBS como blanco para las lecturas en el espectrofotómetro.

$$\% \text{ inhibición ABTS } \bullet = \frac{A_a - A_b}{A_a} \times 100$$

Ec. 22

Dónde: Aa: Absorbancia de la solución de ABTS

Ab: Absorbancia de la mezcla que contiene ABTS y la muestra

7.6.2.2 Método por DPPH

Se evaluó la reducción del radical activo DPPH• siguiendo el método propuesto por Brand-Williams et al. (1995). Se preparó una solución 20 mg/L del reactivo DPPH• en metanol, ajustando su absorbancia entre 0.7-0.9 ($\lambda=515$ nm), con metanol. Se tomaron 3.9 mL de la solución DPPH• ajustada y se hicieron reaccionar con 100 μ L de la muestra dejando reposar por 30 min en oscuridad; la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro UV-visible Jenway (6715) a una $\lambda=515$ nm. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la ecuación 23; además los resultados se expresaron como μ g/mL de trolox usando una curva de calibración de 60-420 ppm de trolox (Anexo 3), se utilizó metanol como blanco para las lecturas en el espectrofotómetro.

$$\% \text{ inhibición DPPH } \bullet = \frac{Aa - Ab}{Aa} \times 100 \quad \text{Ec. 23}$$

Dónde: Aa: Absorbancia de la solución de DPPH

Ab: Absorbancia de la mezcla que contiene DPPH y la muestra

7.6.2.3 Método FRAP

La actividad antioxidante se evaluó también en función de la capacidad reductora del hierro mediante la técnica FRAP, se siguió la metodología descrita por Thaipong et al. (2006) con ligeras modificaciones. Se prepararon 3 soluciones primarias: FeCl₃*6H₂O 20 mM, TPTZ 10 mM en HCl 40 mM, y un buffer de acetatos 300mM pH 3.6 (preparado a partir de 3.1 g de CH₂H₃NaO₂*3H₂O y 16 mL de ácido acético por L de H₂O); y a partir de estas se preparó la solución de trabajo FRAP (el mismo día de uso) en proporción 1:1:10 respectivamente, la cual fue calentada a 37°C. Se hicieron reaccionar 150 μ L de muestra con 2850 μ L de la solución FRAP dejando reposar por 5 min en oscuridad; la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro

UV-visible Jenway (6715) a una $\lambda=593$ nm. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/mL}$ de trolox usando una curva de calibración con concentraciones de 40-300 ppm de trolox (Anexo 4) usando la solución de FRAP como blanco.

7.7 Encapsulación del extracto acuoso de estevia

El proceso de encapsulación de los compuestos fenólicos de la estevia con las pectinas cítricas (toronja y mandarina) se realizó en dos etapas: la primera, la formación de las suspensiones del extracto acuoso de estevia con los agentes encapsulantes; y la segunda, el secado de estas suspensiones en el secador por aspersión. Sin embargo, para realizar las suspensiones acuosas fue necesario preparar los biopolímeros utilizados: goma arábiga seyal, proteína de chícharo (Paxell International S.A. de C.V., 85%) y las pectinas cítricas.

7.7.1 Preparación de agentes encapsulantes

7.7.1.1 Pectina cítrica (PC)

Cada una de las pectinas extraídas, incluyendo la PC, fue disuelta en agua destilada pH 6 a una concentración de 1.2% (p/v), las soluciones se dejaron por 16 h a 4°C para la completa hidratación y disolución de las pectinas. Antes de ser usadas, las soluciones fueron estabilizadas con agitación durante 2 h a 40°C.

7.7.1.2 Proteína de chícharo (PCh)

La solución de proteína de chícharo se preparó disolviendo la muestra al 1.8% (p/v) en agua destilada pH 6 con 16 h de previas a su uso para su completa hidratación. Antes de ser usada, la solución de PCh fue agitada por 2 h a temperatura ambiente seguido de una agitación por 30 min a una temperatura de 50°C (Tantikitti, 2014). Enseguida, la solución fue centrifugada a 3000 rpm durante 30 min, recuperando el sobrenadante.

7.7.1.3 Goma arábiga seyal (GA)

La solución de goma arábiga se preparó al 20 % (p/v) agitando hasta su completa disolución. Se dejó durante 16 h en reposo a 4°C. Antes de ser utilizada se agitó para estabilizar la solución dejando que alcanzara la temperatura de trabajo (25° C).

7.7.2 Formación encapsulados en suspensión

El proceso de formación de las suspensiones se realizó por medio de una mezcla del extracto acuoso de estevia con los agentes encapsulantes, cuya concentración, proporción y orden se muestran en la Figura 12.

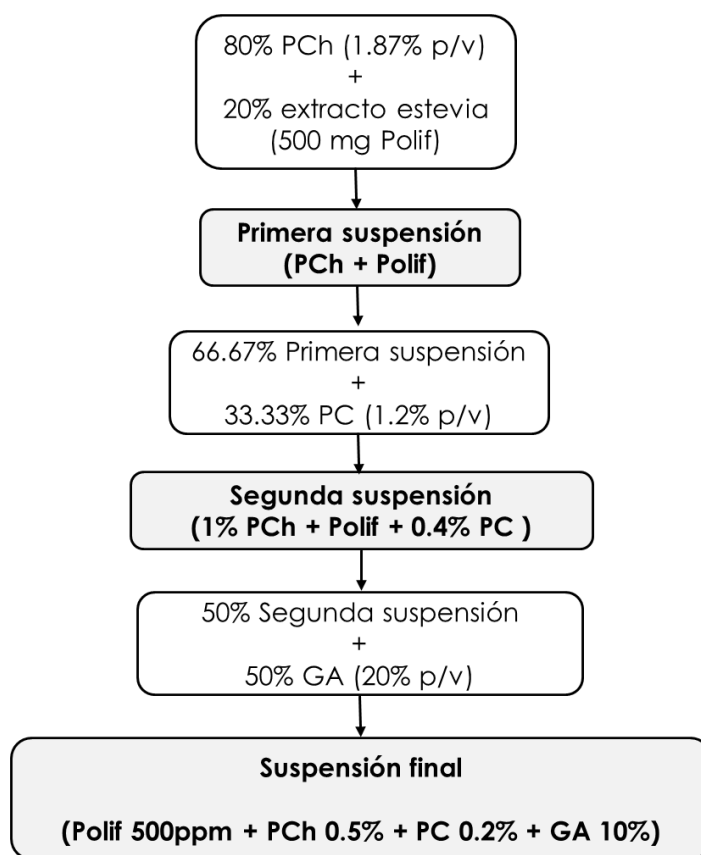


Figura 12. Proceso de formación de suspensiones

El procedimiento de elaboración de las suspensiones se basó en el método de Noello et al. (2016). Primero se mezcló una solución de proteína de chícharo al 1.87% con una solución del extracto de estevia (que contenía 500 mg de polifenoles) en proporción 4:1 (v/v), esta primera suspensión se mezcló a 12000 rpm durante 1 minuto con ayuda de un Ultraturrax marca IKA. Enseguida, a esta primera suspensión se le adicionó una solución de pectina al 1.2% en proporción 2:1 (v/v), homogeneizando la segunda suspensión a 12000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, a esta segunda suspensión se le adicionó la solución de goma arábiga al 20% en proporción 1:1 (v/v), para obtener una suspensión final con 500 ppm de polifenoles, 0.5% de

proteína, 0.2% de pectina y 10% de goma arábiga; esta suspensión fue homogeneizada a 12000 rpm durante 4 minutos antes de ser secada.

Se determinó el % de sólidos totales (°Brix) y el pH en cada solución de los biopolímeros, así como en la suspensión final, con el fin reportar las condiciones del medio en que se realizó el proceso de encapsulación y explicar el efecto que pueda tener en las microcápsulas formadas.

7.8 Proceso de secado por aspersión

Las suspensiones previamente realizadas fueron llevadas a un secador por aspersión (GEA Niro) para obtener las microcápsulas en polvo. Cada una de las suspensiones se hizo pasar por el atomizador con ayuda de una bomba peristáltica Watson Marlon (520S) a un flujo de 15-20 mL/min; la temperatura de entrada de la suspensión al atomizador fue de 160°C para lograr la completa evaporación del agua, mientras que la temperatura de salida de los polvos fue de 80°C con el fin de evitar la absorción de humedad del ambiente.

Con el objetivo de evaluar el efecto encapsulante de las pectinas cítricas extraídas se implementó un diseño factorial 2² (Tabla 8); se evaluó el tipo de pectina (PT y PM) y el método de extracción de cada una (EC y EAU), teniendo como variable de respuesta la eficiencia de encapsulación con base a la concentración de compuestos fenólicos del extracto de estevia encapsulados. Se utilizó un blanco el cual solo contenía los biopolímeros (FF), y como controles se utilizó la pectina cítrica comercial (PC) (EE) para evaluar el efecto de cada pectina según sus características y propiedades, se utilizó un control positivo utilizando un biopolímero comercial de la industria alimentaria CAPSUL (GG) (Ingredion México S.A. de C.V., 2YD509) y como controles negativos un tratamiento sin pectina (biopolímeros + polifenoles de estevia) (HH), y un tratamiento con solo el extracto de estevia seco (II).

7.8.1 Evaluación de las microcápsulas

Las microcápsulas en polvo se almacenaron en frascos ámbar (previamente lavados ver Anexo 1) en un desecador para protegerlos de la luz y la humedad y posteriormente determinar la %Ef-cap y %Ef-lib; así como su posterior caracterización morfológica y fisicoquímica.

Tabla 8. Diseño factorial del proceso de encapsulación

| Tratamiento | | Factores evaluados | | Variable de respuesta |
|-------------|-----------|--|----------------------|--|
| | | Tipo de pectina | Método de extracción | |
| AA | Niveles | -1 | -1 | Eficiencia de encapsulación (% Ef-cap) |
| BB | | +1 | -1 | |
| CC | | -1 | +1 | |
| DD | | +1 | +1 | |
| EE | Controles | Pectina comercial | | |
| FF | | Blanco (Proteína+GA+Pectina) | | |
| GG | | Biopolímero comercial (CAPSUL= almidón modificado)+ES* | | |
| HH | | Negativo (proteína + GA, sin pectina) | | |
| II | | Negativo (extracto de estevia) | | |
| KK | | Positivo goma arábica+ES | | |
| LL | | Negativo (extracto de estevia + pectina cítrica) | | |

*ES=Extracto estevia. Tipo de pectina: mandarina (+1) y toronja (-1); método de extracción: convencional (+1) y ultrasonido (-1); PC = pectina comercial

7.8.1.1 Rendimiento de encapsulación (% R-cap)

El rendimiento de la encapsulación después del secado por aspersión se calculó como la relación del peso del polvo recuperado en el secador por aspersión (P_f) y la cantidad inicial en g de compuestos en la suspensión (P_i) (Di Giorgio et al., 2019).

$$\% R \text{ cap} = \frac{P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{Ec. 24}$$

7.8.1.2 Eficiencia de encapsulación (%Ef-cap)

El porcentaje de eficiencia de encapsulación (%Ef-cap) de los compuestos polifenólicos se realizó de acuerdo con la Ecuación 25:

$$\% Ef\ cap = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad \text{Ec. 25}$$

En donde la concentración inicial (C_i) corresponde a la cantidad de polifenoles en la suspensión a encapsular; mientras que la concentración de los compuestos no encapsulados (C_f), corresponde al contenido de polifenoles en el sobrenadante, el cual se obtuvo de la siguiente manera: 100 mg de polvos fueron resuspendidos en 5 mL de una solución etanol al 50%. La suspensión fue agitada con vortex por 1 min y posteriormente centrifugada 15 min a 4000 rpm a temperatura ambiente.

7.8.1.3 Eficiencia de liberación (%Ef-lib)

El porcentaje de eficiencia de liberación (%Ef-lib) de los encapsulados se realizó de manera secuencial al %Ef-cap. Se evaluaron 7 medios diferentes: 1) dH₂O + sonicación (85% amplitud/5min), 2) medio ácido pH 1 (HCl 0.1 M), 3) medio alcalino pH 12 (NaOH 0.1 M), 4) metanol al 100%, 5) NaCl 2%, 6) una mezcla de etanol:ácido acético:agua (50:8:42 partes) y 7) una mezcla de agua:isooctanol:isopropanol (50:38:12 partes). Para ello 100 mg de los encapsulados se dispersaron en 5 mL de cada solución. Posteriormente, las soluciones fueron centrifugadas a 4000 rpm por 15 min. El análisis se realizó mediante la cuantificación de polifenoles totales, de acuerdo con la ecuación 26:

$$\% Ef\ lib = \frac{\text{Concentración de los compuestos en el sobrenadante}}{\text{Concentración de los polifenoles encapsulados}} \times 100 \quad \text{Ec. 26}$$

Se seleccionó el mejor tratamiento que permitió una mayor liberación de los compuestos fenólicos encapsulados (rompimiento de la cápsula) para reportar los resultados de Ef-lib.

7.8.1.4 Resistencia y estabilidad de los encapsulados al calor

Los polvos (100 mg de muestra) fueron sometidos a un tratamiento térmico en un horno de convección Thermo-Scientific (Heratherm) a 180° C por 25 minutos (Azzurra et al., 2018), posteriormente se dejaron enfriar en un desecador y se calculó la eficiencia de encapsulación tal y como se describe en el apartado 7.8.1.3.

7.8.2 Caracterización fisicoquímica y morfológica de los encapsulados

7.8.2.1. Análisis fisicoquímicos

La a_w y el contenido de humedad de los polvos fueron determinados tal y como se establece en el apartado 7.2.

7.8.2.2 Solubilidad

Se utilizó el método de Chin et al. (2018) con ligeras modificaciones. Una muestra de cada polvo (0.5 g) fue mezclada con 25 mL de dH_2O en un baño de agua a 30°C a 110 rpm por 30 minutos, posteriormente, la muestra fue llevada a una centrifuga a 4700 rpm por 6 min a 4°C. El sobrenadante fue decantado y secado en cápsulas de porcelana (previamente taradas) a 105°C por 16 h. Se calculó el % de solubilidad como la cantidad de polvo solubilizado en el sobrenadante.

7.8.2.3 Higroscopicidad

Una cantidad de 0.5 g de cada polvo fue colocada en una charola de aluminio (previamente tarada) en un desecador (sin silica) con una solución saturada de NaCl al 75% por 7 días a 25°C. Se calculó la cantidad de agua en g que absorbieron las muestras para determinar el % de higroscopicidad (Chew et al., 2018).

7.8.2.4 Humectabilidad

Los polvos (100 mg) fueron rociados (espolvoreados) sobre la superficie de 50 mL de agua destilada a 20°C, se mantuvo la agitación contante a 350 rpm con ayuda de una placa de agitación y calentamiento Thermo-Scientific (SP-131325) (Fuchs et al., 2006).

7.8.2.5 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula promedio se estimó usando un Z-sizer Nano de Malvern-Instrument (ZS90) con una celda de inmersión universal (ZEN1002) a 25 °C, las muestras se trabajaron en proporción 0.5% sonicándose por 15 seg a una amplitud de 40%. Además, los polvos fueron observados en un microscopio óptico con el fin observar su morfología (morfología 2D).

7.9 Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I para analizar los resultados de la siguiente manera:

Todos los análisis de las harinas cítricas se realizaron por duplicado, expresando su promedio y desviación estándar, esto con el fin de comparar los resultados entre las dos variedades.

Todos los análisis de la caracterización de las pectinas fueron realizados por duplicado realizando comparación entre las medias de pectina de toronja, mandarina (extraídas por ambos métodos) y comparándolos con la pectina comercial.

Se utilizó un diseño factorial 3×2 para evaluar los factores en la extracción asistida por ultrasonido de pectina de toronja y mandarina (por separado), eligiendo el mejor método de extracción según los niveles de los factores que tuvieron mayor influencia en la extracción.

Se utilizó un diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto encapsulante de las pectinas cítricas en los compuestos fenólicos de extractos de estevia, reportando el tipo de pectina que tuvo mayor eficiencia de encapsulación.

8. Resultados y discusión

8.1 Caracterización de materia prima

8.1.1 Caracterización fisicoquímica de harinas cítricas

En la Tabla 9 se muestra la composición fisicoquímica de las harinas utilizadas como materia prima para la extracción de pectina. El análisis estadístico reveló que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en todos los parámetros, con excepción de cenizas, fibra y dos coordenadas de color (L^* , a^*) entre las harinas de toronja y mandarina. Dichas diferencias eran de esperarse, puesto que la composición química varía dependiendo el tipo (Barboza, 2013) y origen (Lado, Pintos, Luque, & Moltini, 2016) de cada cítrico, así como también de algunas características externas relacionadas con la corteza, la cual, como se observó en la Figura 9, tiene un grosor distinto.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica a harinas cítricas

| Parámetro | Harina de toronja | Harina de mandarina | |
|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| % Humedad | 4.20 ± 0.46^b | 7.08 ± 0.37^a | |
| % Cenizas | 3.88 ± 0.08^a | 3.87 ± 0.01^a | |
| % Grasa | 1.47 ± 0.38^b | 5.55 ± 0.09^a | |
| % Proteína | 5.19 ± 0.03^b | 7.25 ± 0.00^a | |
| % Fibra cruda | 11.13 ± 0.91^a | 9.99 ± 0.16^b | |
| % Carbohidratos totales | 74.13 ± 1.50^a | 66.26 ± 2.11^b | |
| % Acidez | 0.12 ± 0.00^b | 0.16 ± 0.00^a | |
| pH | 4.42 ± 0.02^a | 4.17 ± 0.01^b | |
| color | L^* | 54.11 ± 0.04^a | 52.82 ± 2.43^a |
| | a^* | 11.84 ± 0.18^a | 11.01 ± 0.34^a |
| | b^* | 24.68 ± 0.03^b | 44.28 ± 1.40^a |
| | c^* | 27.36 ± 0.04^b | 45.62 ± 1.44^a |
| | h° | 64.37 ± 0.36^b | 76.03 ± 0.01^a |

Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar ($n=2$). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ (Tukey).

La presencia de agua en los alimentos es uno de los factores principales que alteran su calidad (Badui, 2006); en el caso de las harinas cítricas, el agua que contienen dependió de las condiciones de secado y probablemente de la estructura de la cascara. En este sentido, la harina de mandarina presentó 2.88% más del contenido de humedad con respecto a la harina de toronja, sin embargo, los valores obtenidos se encuentran dentro del límite máximo permisible de humedad en harinas, el cual es del 15% de acuerdo a lo establecido en la NOM-247-SSA1-2008. El pH puede utilizarse para controlar la presencia de microorganismos en alimentos, por lo que valores de pH bajo en las harinas indica un ambiente que limita el crecimiento de éstos. Se han reportado que en el caso de los cítricos el pH oscila entre 3 y 4, esto debido a un aumento en la acidez ocurrida por la disociación de sales de citrato (Badillo & Pilamunga, 2011); de igual manera, se considera el % de acidez titulable como un índice de deterioro, ya que representa a los ácidos orgánicos libres, en este caso ácido cítrico y que en ambas variedades se encuentra entre 0.12 y 0.16%.

En cuanto al contenido de cenizas, estas representan la cantidad de materia inorgánica en las harinas, principalmente minerales, por lo que en cítricos se considera un valor bajo. Ambas harinas presentan 3.8% de cenizas; este resultado se asemeja a los reportados para otros cítricos de 2.99, 3.96, 4.86, 3.07-3.24 y 3.07% para toronja, mandarina, naranja (Rincón et al., 2005), limón persa (Badillo & Pilamunga, 2011), y lima respectivamente (Siqueira et al., 2017).

Rincón et al. (2005) reportaron 2.01 y 1.45% de grasa para la harina de toronja y mandarina respectivamente. Los resultados mostraron que la harina de toronja tiene menos grasa (1.47 ± 0.38) que la reportada, y la de mandarina mucha más grasa (5.55 ± 0.09); este último resultado se debe a que el contenido de aceites en la mandarina incrementa el contenido de grasa, dichos aceites pueden variar dependiendo el tipo de cítrico.

Al igual que las grasas, el mayor contenido de proteína se presentó la harina de mandarina, con resultados aproximados a los reportados por Gutiérrez et al. (2016) de 8.14% y Rincón et al. (2005) de 7.55%. No obstante, debido a que las principales proteínas de las cáscaras de los cítricos son las glucoproteínas presentes en la pared celular primaria donde forman una red de microfibrillas con la celulosa, pueden variar con el grosor de la cascara y el grado de maduración (Rincón et al., 2005).

La fibra cruda está constituida por compuestos poliméricos fibrosos (Badillo & Pilamunga, 2011); en el caso de las harinas cítricas se representa por una parte fibrosa e indigerible que está constituida de celulosa, hemicelulosa y lignina (95-98%), y por una parte soluble que constituyen las sustancias pécticas (2-5%) (Rincón et al., 2005). El contenido de fibra cruda en las harinas no presentó diferencias estadísticas significativas entre ambos cítricos; se han reportado 43.84 y 28.61% de fibra dietética total e insoluble respectivamente para harina de mandarina (Gutiérrez & Pascual, 2016), 61.79% de fibra dietética total para harinas de toronja (Wang et al., 2015), 4.64-6.52% de fibra cruda para harinas de limón persa (Badillo & Pilamunga, 2011), y valores entre 15.5-16.1% de fibra cruda para harinas de limón italiano (López et al., 2014)(López Domínguez et al., 2014).

El contenido de Extracto Libre de Nitrógeno (carbohidratos totales) fue mayor en la harina de toronja, al igual que la fibra cruda, lo que puede hacer referencia a una fuente prometedora para la extracción de pectina. López et al. (2014). han reportado valores de carbohidratos entre 74 y 79% para harinas de limón italiano y Siqueira et al. (2017) de 20.98% para lima.

El color es un atributo importante en la percepción sensorial de las harinas y los productos que se elaboren a base de ellas (Baas et al., 2015). Las harinas cítricas presentaron una menor luminosidad en comparación con harinas comerciales como la de trigo y maíz, esto se debe a la oxidación de algunos pigmentos naturales y azúcares reductores presentes en los cítricos por efecto de la temperatura de secado. En el caso de la harina de mandarina, los valores superiores de b^* y h° indican una mayor tendencia a un tono amarillo-opaco en comparación con la harina de toronja; esto puede deberse a que la mandarina es un cítrico que contiene carotenos (136 μg β -caroteno/fruto) por lo que proporciona pigmentos relacionados a esta tonalidad de color (Rainey & Caballero, 2017).

Las diversas discrepancias observadas entre los resultados de ambos frutos y con otros autores pueden atribuirse a diferencias en el tipo de suelo, clima, variedad estudiada, estacionalidad, entre otros factores (López et al., 2014). A pesar de esto; los resultados obtenidos sugieren a las harinas cítricas como materia prima para el desarrollo de nuevos alimentos; además, por el elevado contenido de fibra cruda se pueden predecir como una opción factible para la extracción de pectinas.

8.1.2 Caracterización de harinas de estevia

Con el fin de evaluar la harina de estevia antes extraer los compuestos bioactivos se procedió a conocer algunos parámetros fisicoquímicos. El pH de la harina fue de 5.11 ± 0.02 , en cuanto a la humedad, Goyal et al. (2010) reportaron que las hojas de estevia en fresco contienen 82.30%, de agua y, una vez convertidas en polvos finos (harinas) disminuye a 9.31%, tal y como sucedió con la harina de estevia secada a 50°C, en donde el contenido de humedad fue de $8.73 \pm 0.37\%$ y su actividad de agua de 0.57 ± 0.01 , esta última, fue menor a 0.94 reportada por Jeria et al. (2011) para hojas de estevia.

El contenido de cenizas en la harina de estevia ($6.43 \pm 0.02\%$) fue similar al reportado por Goyal et al. (2010) de 6.3%. Duran et al. (2012) relacionan el contenido de cenizas de la estevia con algunos minerales como el Co^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , K^+ , P^{-3} , Zn^+ , Na^+ y Ca^{+2} ; en este sentido, existen productos comerciales de estevia en polvo como el Mayan Sweet® (Polvo extra fino de estevia orgánica) que presentan un contenido de minerales del 7.53%.

8.2 Rendimientos de la extracción de pectina

8.2.1 Método convencional

En la Tabla 10 se muestran los rendimientos de extracción de las pectinas cítricas obtenidas por el método convencional a diferentes temperaturas. En cuanto a la pectina de toronja, se han reportado rendimientos usando este método del 18% (Yeoh et al., 2008) y 19.16% (Bagherian et al., 2011), los cuales están dentro del rango obtenido ($\text{PTC}=15.76 \pm 0.82\%$ y $19.75 \pm 0.46\%$); mientras que para la pectina de mandarina (PMC) son más bajos, entre $8.22 \pm 0.45\%$ y $12.44 \pm 1.75\%$, pero similares a 10.5% reportado por Chang-Won et al. (2003) para este cítrico.

Se puede observar que se extrajo una mayor cantidad de pectina a 90°C tal y como lo menciona Pineda (2003), que a temperaturas elevadas la eficiencia es mayor siempre y cuando sean controladas a través del tiempo, ya que altas temperaturas durante tiempo excesivo pueden ser perjudiciales para la pectina.

En este sentido, se hace referencia a que el efecto de la temperatura de extracción también se puede ver reflejado en algunas propiedades estructurales de la pectina, un ejemplo sencillo es la disminución significativa ($p < 0.05$) ocurrida en el grado de esterificación (%GE) al utilizar una temperatura elevada (Tabla 10); Baltazar et al. (2013) reportaron un comportamiento similar en

la extracción de pectina de limón; esto se debe a que la temperatura puede ayudar a destruir las paredes celulares de las harinas y por lo tanto aumentar el área de contacto (o área de reacción) entre los iones de hidrógeno y la pectina (Guo et al., 2017), lo que probablemente genera una mayor hidrólisis de los enlaces éster en la cadena polimérica de ácidos galacturónicos.

Tabla 10. Rendimientos de extracción de pectina por el método convencional

| Tipo de pectina | 80°C | | 90°C | |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | % Rend | GE % | % Rend | GE % |
| Pectina de toronja | 15.76 ± 0.82 ^{Da} | 84.25 ± 2.98 ^{Aa} | 19.95 ± 0.46 ^{Ca} | 74.18 ± 2.65 ^{Ba} |
| Pectina de mandarina | 8.22 ± 0.45 ^{Db} | 82.30 ± 2.95 ^{Aa} | 12.44 ± 1.75 ^{Cb} | 74.92 ± 1.84 ^{Ba} |

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=3). Letras mayúsculas diferentes en la misma fila y letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas p<0.05 (Tukey). %Rend= Rendimiento de extracción, GM= grado de esterificación.

Por lo anterior, se observa que a temperaturas elevadas de extracción se obtienen porcentajes de rendimiento (%Rend) más altos en comparación con temperaturas menores, pero con el GE sucede lo contrario. Con base en esto se definió la temperatura de 80°C para extracciones posteriores (segunda extracción) y para la EAU, esto con el fin de extraer pectinas altamente esterificadas, ya que esta característica es responsable de la propiedad gelificante de las pectinas (Seixas et al., 2014), la cual puede contribuir a la formación de cápsulas.

8.2.2 Método asistido por ultrasonido

Los rendimientos de extracción de pectina de la harina toronja, oscilaron entre 14.52 ± 0.99% y 18.88 ± 1.09% (Tabla 11) en los tratamientos realizados. El ANOVA del diseño factorial arrojó que la amplitud de onda es el principal factor que afecta significativamente (p=0.0029, ver Anexo 5) el rendimiento de extracción (Figura 13A), el cual fue mayor en los tratamientos sometidos a amplitudes elevadas (90%); Carrera et al. (2012) reportaron el uso de amplitudes de onda del 20 y 50% en la extracción de algunos compuestos vegetales a través de la EAU, concluyendo que a una mayor amplitud los rendimientos aumentan. Esto se debe a que el número de ciclos de compresiones y rarefacciones de las ondas (cavitación) aumentan al incrementar la amplitud favoreciendo una mayor extracción de pectina. (Al-dhabi et al., 2017),

Tabla 11. Matriz de diseño factorial para la extracción de pectina de toronja

| Tratamiento | Amplitud (%) | Tiempo (min) | % Rendimiento |
|-------------|--------------|--------------|---------------|
| PTU-1 | 70 | 15 | 14.91 ± 0.88 |
| PTU-2 | 70 | 30 | 15.68 ± 1.07 |
| PTU-3 | 80 | 15 | 14.52 ± 0.99 |
| PTU-4 | 80 | 30 | 15.48 ± 0.58 |
| PTU-5 | 90 | 15 | 16.97 ± 1.20 |
| PTU-6 | 90 | 30 | 18.88 ± 1.09* |

Los valores presentados son el promedio y desviación estándar (±) (n=3). *Tratamiento seleccionado.

El análisis de varianza realizado a los factores evaluados arrojó que también el tiempo ($p=0.0239$, ver Anexo 5) tiene un efecto significativo en el rendimiento de extracción de pectina utilizando la EAU, siendo mayor en los tratamientos que se sonicaron por 30 min; esto coincide con los trabajos realizados por Wang et al. (2015) y Liew et al. (2016), en donde se ha establecido un tiempo óptimo de extracción para la pectina de toronja de 27.95 y 27.52 min de sonicación respectivamente.

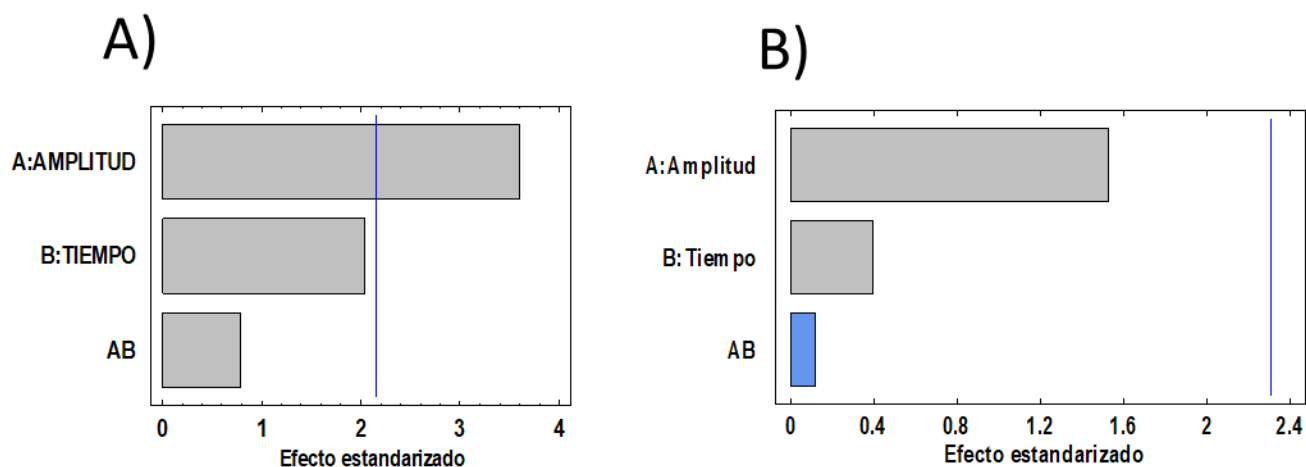


Figura 13. Diagramas de pareto de los efectos significativos en el rendimiento de extracción de pectina de harinas cítricas: A) toronja, B) mandarina

El tratamiento seleccionado fue PTU-6 para realizar extracciones posteriores de pectina de toronja, esto debido a que en la Figura 14A se observa que con una amplitud de 90% y un tiempo de extracción de 30 min se obtiene el mayor rendimiento de extracción, es decir, un $18.88 \pm 1.09\%$.

Al comparar estos resultados de la extracción de pectina con ultrasonido (EAU) con los obtenidos con el método convencional (EC), se observa que el %Rend obtenido con EAU fue mayor ($18.88 \pm 1.09\%$) que el obtenido con EC ($15.76 \pm 0.82\%$). Estos resultados concuerdan con los reportados por Freitas et al. (2016), en donde señalan la efectividad de la EAU en la extracción de pectina; esto debido a que la cavitación genera un mayor daño a la pared celular, lo que conlleva a mejores interacciones entre el disolvente y la materia prima permitiendo una mayor liberación de pectina (Grassino et al., 2016).

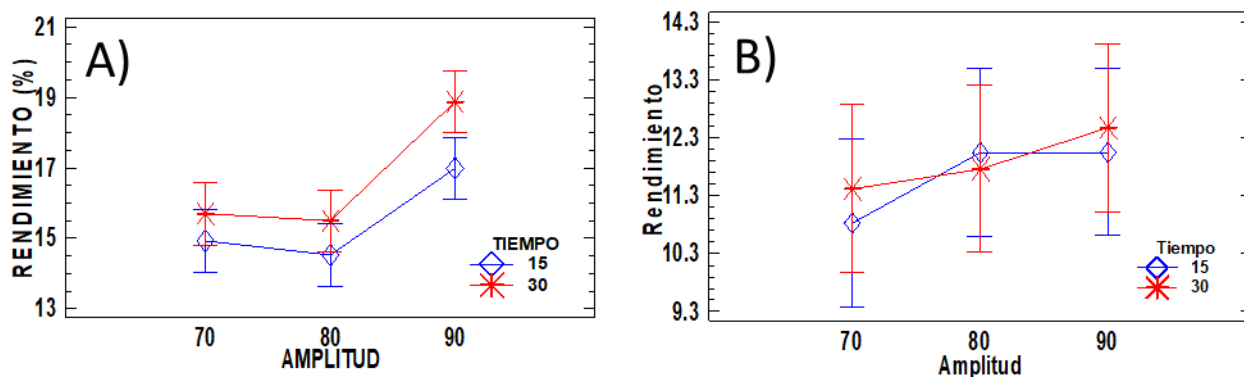


Figura 14. Graficas de interacción de los factores evaluados en el rendimientos de extracción de pectina de harinas cítricas: A) toronja, B) mandarina

Por otra parte, en la extracción de pectina de mandarina los rendimientos de los tratamientos realizados estuvieron entre 10.82 ± 0.13 y $12.46 \pm 1.68 \%$ (Tabla 12). El análisis estadístico del diseño factorial no mostró efecto significativo de los dos factores evaluados (amplitud $p=0.1654$ y tiempo $p=0.7016$, Anexo 4) en la extracción (Figura 13B).

Tabla 12. Matriz de diseño factorial para la extracción de pectina de mandarina

| Tratamiento | Amplitud (%) | Tiempo (min) | % Rendimiento |
|-------------|--------------|--------------|---------------|
| PTU-1 | 70 | 15 | 10.82 ± 0.13 |
| PTU-2 | 70 | 30 | 11.41 ± 0.50 |
| PTU-3 | 80 | 15 | 12.04 ± 1.30 |
| PTU-4 | 80 | 30 | 11.76 ± 1.30 |
| PTU-5 | 90 | 15 | 12.05 ± 1.35* |
| PTU-6 | 90 | 30 | 12.46 ± 1.68 |

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). *Tratamiento seleccionado.

En la Figura 14B se puede observar que, al igual que en la extracción de pectina de toronja, existe una tendencia a obtener una mayor cantidad de pectina de mandarina con amplitudes elevadas, de hecho, existen reportes como el de Carrera et al. (2012) y Neria et al. (2015) que avalan este comportamiento. Con base en esto se seleccionó a PTU-5 con un rendimiento del $12.05 \pm 1.35\%$ como el mejor tratamiento para extracciones posteriores, el cual consistió en una amplitud de 90% por 15 min. Cabe mencionar que se eligió este tiempo de 15 min, ya que en comparación con el de 30 min, se obtuvieron rendimientos estadísticamente iguales ($p=0.7016$) pero con un ahorro de energía considerable; además de evitar posibles daños a la pectina derivados de tiempos prolongados de extracción.

Al igual que en la harina de toronja, en la harina de mandarina el ultrasonido ($12.05 \pm 1.35\%$) presenta mayores rendimientos de extracción en comparación con la EC ($8.22 \pm 0.45\%$), y además, es mayor al 10.5% reportado por Chang-Won et al. (2003).

8.2.3 Segunda extracción

Los tratamientos seleccionados en la EC (PTC y PMC) y en la EAU (PTU y PMU) fueron aplicados para una segunda extracción de pectina y determinar el rendimiento total de cada pectina (%T-Rend). La Figura 15 muestra los %Rend de cada pectina después de la primera y segunda extracción, así como el %T-Rend.

El efecto que tuvo esta segunda extracción permitió aumentar la cantidad de pectina extraída de las harinas de toronja (PTC y PTU); resultando más eficiente la EC que la EAU, con un 52.79 y 34.95% respectivamente comparando con la primera extracción. Sin embargo, el rendimiento total de pectina extraída (%T-Rend) después de la segunda extracción no tuvo diferencia estadística significativa ($p=0.1677$) entre EAU ($25.48 \pm 1.07\%$), y la EC ($24.08 \pm 0.95\%$). Estudios previos como el de Wang et al. (2015) reportan que el %T-Rend de pectina de toronja al usar los mismos métodos de extracción es mayor en la EAU ($27.34 \pm 0.25\%$) en comparación con la EC ($23.50 \pm 0.57\%$), además Xu et al. (2014) reportaron un rendimiento del 26.74% para este cítrico; estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo.

Estos resultados sugieren que es necesaria la segunda extracción para recuperar la mayor cantidad de pectina de toronja de la harina residual en ambos métodos; y pese a que no existen diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) entre los rendimientos totales, se propone a la EAU como método de extracción ya que solo se requiere el 33% del tiempo necesario para realizar la extracción por EC, lo cual representaría un mayor ahorro energético.

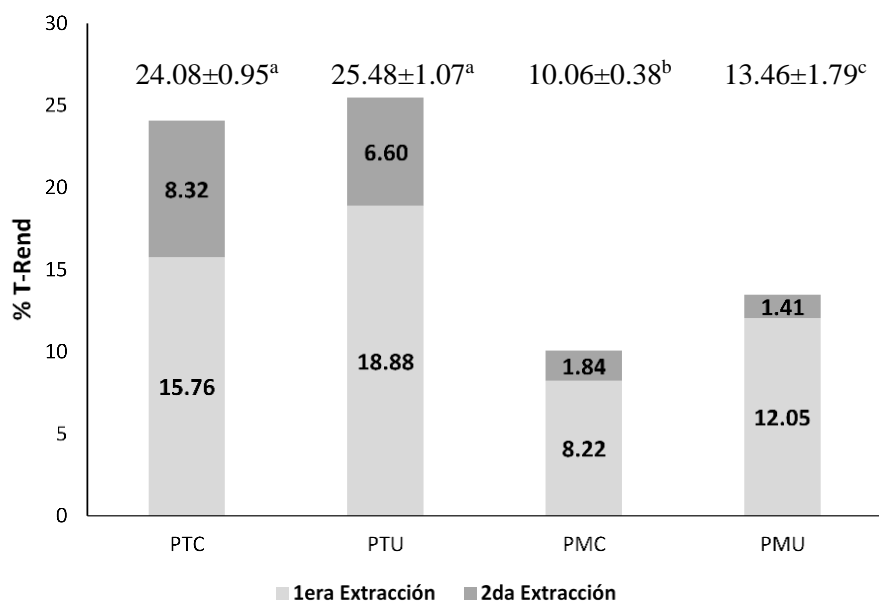


Figura 15. Rendimientos totales de pectinas cítricas.

PTC= Pectina de toronja método convencional, PTU= Pectina de toronja método ultrasonido,
 PMC= Pectina de mandarina método convencional, PMU= Pectina mandarina método ultrasonido

La segunda extracción de la pectina de mandarina también favoreció el rendimiento como sucedió con la pectina de toronja, ya que representó un aumento del 22.38 y 11.70% para la EC y EAU respectivamente con respecto a la primera extracción. El %T-Rend fue significativamente mayor ($p=0.0414$) en la EAU ($13.46 \pm 1.79\%$) que en la EC ($10.06 \pm 0.38\%$). Se puede observar (Figura 15) que la harina de mandarina tiene un contenido de pectina menor al de la harina de toronja, ya que independientemente del método empleado, la cantidad obtenida representa entre el 40 y 50% de pectina en comparación con la de toronja; estos resultados coinciden con el bajo contenido de carbohidratos totales determinados en la harina de mandarina (apartado 8.1.1) en comparación con los determinados en la harina de toronja. Esto sugiere que el contenido de pectina en las cáscaras de ambos cítricos es diferente, siendo la mandarina la que posee un contenido menor en comparación con la toronja.

Por lo tanto, la segunda extracción no representa un proceso necesario para incrementar el rendimiento de extracción de la pectina de mandarina, ya que la EAU con una sola extracción ($12.05 \pm 1.35\%$) presenta resultados estadísticamente iguales ($p>0.05$) al %T-Rend ($13.46 \pm 1.79\%$). Al comparar los tiempos de extracción de ambos métodos, la EAU requiere solamente un 16% del tiempo que requiere la EC, siendo el ultrasonido una prometedora opción para la extracción de pectina de mandarina.

8.2.4 Cantidad total de pectina (%Pect-T)

La **Tabla 13** muestra la comparación entre el %Rend de la primera extracción de las pectinas cítricas con respecto a la cantidad total de pectina (%Pect-T).

Tabla 13. Cantidad total de pectina en harinas cítricas.

| Tipo de pectina | %Rend* | Equivalencia | %Pect-T |
|-----------------|------------------|--------------|---------|
| PTC | 15.76 ± 0.82 | 53% | 29.60 % |
| PMC | 8.22 ± 1.09 | 60% | 13.77% |
| PTU | 18.88 ± 1.09 | 64% | 29.60% |
| PMU | 12.05 ± 1.35 | 87% | 13.77% |

*%Rend de la primera extracción. Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar ($n=3$).

Para la pectina de toronja extraída mediante la EC, se observó que una sola extracción no es suficiente para recuperar toda la pectina extraída, ya que solo se obtiene el 53% de la pectina total que contiene este cítrico, mientras que con EAU se obtiene el 64%; esto puede deberse a que este polisacárido que se encuentra en la corteza de los frutos en forma de protopectina (polisacárido péctico unidos a compuestos de la pared vegetal como la celulosa) no fue hidrolizada lo suficiente para obtener la pectina, sin embargo, los resultados obtenidos con la segunda extracción utilizando solo agua, señalan lo contrario ya que se recuperó el 28% y 22% adicional para EC y EAU respectivamente (Figura 15). Esto sugiere que la difusión de la pectina obtenida durante la hidrólisis ácida no fue la adecuada en la primera extracción, ya que el solvente (ácido cítrico 0.1N) alcanzó la saturación con la que se solubilizó durante este primer proceso; de ahí que, al contacto con el agua para la segunda extracción, la pectina libre fácilmente difundió a este medio líquido (Adetunji et al. 2017). Estos resultados indican que es necesaria una segunda extracción para obtener mayor rendimiento.

La pectina de mandarina extraída por la EC, representó un 80% del %Pect-T, mientras que la extraída a partir de la EAU representó 87%; de esta manera se puede establecer que, a pesar que este cítrico tiene menor cantidad de pectina en comparación con la toronja (Figura 15), con una sola extracción se puede extraer más del 80 %, de la %Pect-T, esto debido posiblemente a la disponibilidad física-estructural de la materia prima para que ocurra el daño a la pared celular, y por lo tanto, la liberación de pectina.

8.3 Caracterización de pectinas

Se realizaron una serie de análisis de las propiedades funcionales y fisicoquímicas de las pectinas obtenidas a partir de la EAU (PTU y PMU), con el fin de comprender su posible efecto al utilizarlas como matrices en la encapsulación de extractos de estevia, comparando con las pectinas obtenidas por la EC (PTC y PMC) y la pectina cítrica comercial (PC) con el fin de evaluar el efecto del ultrasonido en dichas propiedades.

8.3.1 Caracterización fisicoquímica

La Tabla 14 muestra los resultados de la caracterización fisicoquímica realizada a las pectinas cítricas. El pH de las pectinas es ~3, este parámetro se considera importante para la encapsulación, ya que a pH bajo los grupos ácidos se encuentran en forma no ionizada generando repulsiones de cargas, mientras que a pH alto los grupos carboxilo se encuentran

ionizados adquiriendo carga negativa. Existe una relación directa entre el pH y la acidez libre, ya que los valores de acidez son mayores cuando el pH utilizado durante la extracción es extremo (ácidos fuertes), de esta manera se desesterifican los grupos carboxilos para aumentar su presencia como grupos ácidos y por lo tanto su acidez (Cabarcas et al., 2012); esta pectina tiene valores bajos de acidez en comparación con la pectina de limón que tiene 2.03 ± 0.04 mEq carboxilos/g (Ayora-Talavera et al., 2015) pero superiores a la pectina de mango que tienen entre 0.011 y 0.091 mEq carboxilos/g (Gamboa & Duerto, 2009).

El contenido de humedad debe ser bajo, ya que una pectina muy húmeda tiene menor estabilidad y tiempo de vida; se han reportado valores entre 7.76-11.04% para pectinas cítricas (D'Addosio et al., 2005; Ramos & López, 2015); en la pectinas extraídas la humedad fue estadísticamente similar ($p > 0.05$) de ~9%. Existe una relación compleja entre la humedad (contenido de agua) y la A_w , ya que con esta última tiene incidencia en algunas características de calidad, de hecho, se considera que a una A_w por debajo de 0.60 no hay multiplicación de microorganismos (NOVASINA, 2018); en las pectinas, la A_w se encontró entre 0.450 y 0.560, siendo un valor aceptado para su almacenamiento.

Un elevado contenido de proteína en las pectinas puede ser ventajoso en el proceso de encapsulación, ya que se ha comprobado que la sinergia entre los grupos funcionales de proteína/polisacáridos mejora la estabilidad química y coloidal de los sistemas de encapsulación (Ghasemi et al., 2018). Se han reportado valores de proteína en pectinas de mandarina entre el 8.0-12.7% (Colodel et al., 2018) y del 2.1% para la de toronja (Liew et al., 2018); mientras que en las pectinas extraídas los valores fluctuaron entre 2.15 a 4.10% y 4.81 a 6.31 %, para las pectinas de toronja y mandarina respectivamente. Se observa que la concentración de proteína fue ligeramente más alta en las de mandarina, esto coincide con el porcentaje de proteína cuantificada en las harinas (Tabla 14); este hecho puede deberse a que durante la extracción, principalmente la EAU, se acarrearán algunos grupos proteicos que se adhieren a la cadena de pectina (Preece et al., 2017); pese a esto, se establece que el porcentaje de proteínas en pectinas se considera $< 10\%$ según los valores reportados de 2.7% para la pectina manzana (Sharma et al., 2006), de 1.3-1.7% de pulpa de remolacha azucarera (Fishman et al., 2013), de 4.74-5.94% de mango (Wang et al., 2016), y de 3.96-5.84% de granada (Abid et al., 2017).

Tabla 14. Caracterización fisicoquímica a pectinas cítricas

| Parámetro | Pectina cítrica comercial | Pectina método convencional | | Pectinas método ultrasonido | | |
|------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | PT | PM | PT | PM | |
| pH | 3.22 ± 0.12 ^a | 3.46 ± 0.07 ^a | 3.70 ± 0.13 ^a | 3.21 ± 0.18 ^a | 3.57 ± 0.39 ^a | |
| Aw | 0.530 ± 0.00 ^b | 0.500 ± 0.01 ^c | 0.560 ± 0.01 ^a | 0.540 ± 0.00 ^{ab} | 0.450 ± 0.00 ^d | |
| % humedad | 9.65 ± 0.51 ^a | 9.85 ± 0.08 ^a | 8.72 ± 0.46 ^a | 10.49 ± 1.79 ^a | 9.84 ± 1.33 ^a | |
| % de cenizas | 8.86 ± 3.13 ^a | 2.78 ± 0.01 ^b | 3.29 ± 0.03 ^b | 1.95 ± 0.28 ^b | 3.55 ± 0.01 ^b | |
| % proteína | 3.36 ± 0.06 ^{bc} | 2.15 ± 0.12 ^c | 6.31 ± 1.01 ^a | 4.10 ± 0.20 ^{abc} | 4.81 ± 0.23 ^{ab} | |
| % azúcares totales | 28.70 ± 1.24 ^a | 30.39 ± 1.99 ^a | 24.31 ± 1.98 ^a | 28.58 ± 2.07 ^a | 26.30 ± 2.15 ^a | |
| Acidez libre (mEq de carboxilos/g) | 0.62 ± 0.04 ^a | 0.73 ± 0.13 ^a | 0.68 ± 0.05 ^a | 1.39 ± 0.13 ^a | 1.24 ± 0.58 ^a | |
| Parámetros de color | L* | 75.91 ± 0.99 ^a | 51.56 ± 0.32 ^c | 45.94 ± 2.20 ^d | 62.16 ± 0.31 ^b | 45.59 ± 1.08 ^d |
| | a* | 2.77 ± 0.12 ^c | 7.07 ± 1.68 ^{ab} | 8.16 ± 0.65 ^a | 5.24 ± 0.17 ^{bc} | 8.15 ± 0.03 ^{ab} |
| | b* | 15.74 ± 0.35 ^c | 15.89 ± 2.36 ^c | 26.05 ± 0.99 ^b | 23.12 ± 0.86 ^b | 33.71 ± 0.52 ^a |
| | c* | 15.98 ± 0.37 ^c | 17.46 ± 2.29 ^c | 27.30 ± 1.13 ^b | 23.71 ± 0.88 ^b | 34.68 ± 0.50 ^a |
| | h° | 80.01 ± 0.21 ^a | 65.86 ± 6.05 ^b | 72.61 ± 0.74 ^{ab} | 77.24 ± 0.04 ^a | 76.41 ± 0.25 ^a |

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas con respecto a p=0.05 (Tukey).

El contenido de cenizas en las pectinas constituye la parte insoluble de la fibra, que generalmente se asocia principalmente a la presencia de algunos minerales como Mg⁺, Na⁺, Fe⁺² y Ca⁺²; éste último representa un rol estructural en las paredes celulares ligándose a los grupos carboxilo de la pectina bajo la forma de pectatos (D'Addosio et al., 2005), En este sentido, Grassino et al. (2016) reportan entre 55-60% de pectato de calcio para la pectina de tomate cuando las cenizas son de ~1.2%; en las pectinas cítricas extraídas en este trabajo, el contenido de ceniza osciló entre 1.95 a 3.55%, y fue estadísticamente inferior a la PC (p<0.05); se han reportado valores entre 3.75-6.90% para la pectina de maracuyá (D'Addosio et al., 2005) y 7.33-11% para la de mango (Gamboa, 2009).

En cuanto al contenido de azúcares los valores estuvieron entre 24.31 ± 1.98% y 30.39 ± 1.99%, siendo la PTC y PTU las que presentaron un mayor contenido de azúcares con respecto a las

pectinas de mandarina; Wang et al. (2015), reportaron 77.85 y 78.85% para la pectina de toronja obtenida a través de EC y EAU respectivamente, por lo que tal vez los bajos resultados obtenidos en las pectinas extraídas en este trabajo, pueden deberse a una oxidación de los azúcares por efecto de la temperatura durante el secado, lo cual también puede verse reflejado en cambios físicos en la textura y color de las pectinas. En la Figura 16 se muestra la apariencia física de las pectinas; en donde, los parámetros de color (CIELab) mostraron que la PC es significativamente más luminosa ($p < 0.05$) con respecto al resto de las pectinas (Tabla 14); esto probablemente se debe a que al ser de grado analítico, su obtención incluye una clarificación para obtenerla con características estandarizadas. Las pectinas de mandarina y toronja muestran una tonalidad con una tendencia ligera a tonos verde según el parámetro a^* ; y muestran una tendencia media a tonalidad amarilla (b^*), principalmente las pectinas de mandarina.

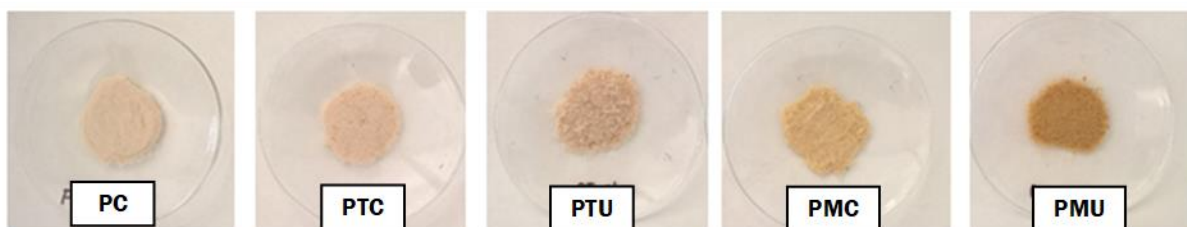


Figura 16. Pectinas cítricas extraídas.

PC= pectina comercial, PTC= pectina toronja convencional, PMC= pectina mandarina convencional, PTU= pectina toronja ultrasonido, PMU= pectina mandarina ultrasonido.

8.3.2 Caracterización estructural

La Tabla 15 muestra los resultados de la caracterización estructural de las pectinas, en donde se muestra que todas, incluyendo la PC, son de alto metoxilo (%GE entre 71.80-84.90%); se puede observar que el %GE en las pectinas obtenidas por la EC es significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con la EAU, esto puede deberse a una posible desesterificación de la cadena de pectina por efecto de cavitación en el ultrasonido; pese a esto, este método permite obtener una mayor cantidad de pectina altamente metoxilada, debido a que contienen más del 50% de los grupos carboxilos esterificados con un grupo metilo (Aldana-Villarruel et al., 2011). La PTU mostró un %GE del $72.14 \pm 0.10\%$, que es similar al de reportes previos de 75.61% (Bagherian

et al., 2011) y superior a 65.52% (Wang et al., 2015) que utilizaron el mismo método y ácido cítrico. En el caso de la PMU, el %GE fue de $71.81 \pm 1.64\%$, mayor a los ya reportados, que se encuentran entre el 68-72.2% (Chang-Won et al., 2003) y entre 34.1-38.4% (Colodel et al., 2018), quienes utilizaron ácido cítrico con la extracción convencional.

Las pectinas extraídas tuvieron un contenido de ácido galacturónico (%AcGal) de 54.34% a 76.03%, de hecho su cadena principal (homogalacturonanos) fue significativamente diferente ($p < 0.05$) en comparación con la PC; la importancia de este parámetro radica en su utilidad para determinar la calidad y aplicación de una pectina; por ejemplo, para su uso en alimentos debe contener al menos 65% de ácido galacturónico (Pagliaro et al., 2016). En este sentido, las pectinas de toronja son de cadenas más grandes que las de mandarina, ya que éstas últimas solamente contiene el $54.34 \pm 1.21\%$ de AcGal. Se han reportado valores de AcGal del 56.39 y 68.36% para la pectina de toronja obtenida por EC y EAU respectivamente (Wang et al., 2016), mientras que los obtenidos fueron del 76.03 y 71.01%.

Tabla 15. Caracterización estructural a las pectinas extraídas.

| Parámetro | PC | PTC | PMC | PTU | PMU |
|------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| %GE | 84.90 ± 1.13^a | 84.25 ± 2.98^a | 82.30 ± 2.96^a | 72.14 ± 0.10^b | 71.81 ± 1.64^b |
| %AcGal | 85.12 ± 1.34^a | 76.03 ± 2.68^a | 63.07 ± 2.52^{bc} | 71.01 ± 1.48^b | 54.34 ± 1.21^c |
| PMol (kDa) | 92.64 ± 1.09^b | 123.60 ± 2.04^a | 48.70 ± 0.54^c | 95.35 ± 1.78^b | 46.59 ± 0.50^c |

Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar ($n=2$). Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas con respecto a $p=0.05$ (Tuckey). PC= pectina comercial, PTC= pectina toronja convencional, PMC= pectina mandarina convencional, PTU= pectina toronja ultrasonido, PMU= pectina mandarina ultrasonido.

Es importante mencionar que tanto el %GE como el %AcGal desempeñan la principal función estructural en la cadena de pectina; el GE representa a los grupos carboxilo del total de la cadena de ácido galacturónico que están esterificados (Farris et al., 2009), pero no necesariamente existe una relación entre ambos, es por eso que la PMU, a pesar de tener un %AcGal $< 65\%$ es de alto metoxilo. Sin embargo, el %AcGal si está relacionado con el peso molecular (PMol), ya

que ambos hacen referencia al tamaño de la cadena de ácidos galacturónicos. El PMol fue significativamente mayor en las pectinas de toronja (PTC=123.60±2.04 y PTU=95.35±1.78 kDa) con respecto a las de mandarina.

En cuanto al efecto de la EAU, se observó que el PMol de las pectinas disminuyó en un 22.85% para toronja y 4.33% para mandarina. Wang et al. (2016) reportaron que el PMol de la pectina de toronja extraída por este método disminuyó el 27.51% con respecto a la EC. También se pudo observar que la EAU dio lugar a cambios en las propiedades estructurales de la pectina (GE, y AcGal); estos resultados sugieren una despolimerización de la cadena causada por la intensidad del ultrasonido, ya que estos efectos fueron reportados con anterioridad en pectinas de toronja (Xu et al., 2014), e incluso Zhang et al. (2013) reportaron la EAU como un nuevo método de modificación de pectina.

Lo anterior, no significa que las pectinas obtenidas mediante EAU, especialmente la PMU, no tengan aplicaciones en la industria alimentaria. Se ha reportado el uso de pectinas de bajo metoxilo (%GE<50%) para la elaboración de productos *light* y/o de dieta (bajos en azúcares) (Freitas et al., 2016), incluso se demostró que este tipo de pectinas proporciona firmeza y resistencia a tabletas/cápsulas utilizadas como vehículos de administración de fármacos (Chomto & Nunthanid, 2017). Cabe mencionar que las pectinas de cadena corta (AcGal<65% y bajos PMol) son polisacáridos mucho más fáciles de absorber por el cuerpo humano y por lo tanto más saludables (Wang et al., 2017), por lo que recientes estudios han comenzado a evaluar su potencial uso como prebiótico (Gómez et al., 2016).

El espectro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) confirmó la estructura de todas las pectinas e identificó los principales grupos funcionales (Figura 17). El rango de longitud de onda de 900 a 1200 cm^{-1} es considerado la región dactilar para carbohidratos (Posé et al., 2012), y permitió la identificación de grupos funcionales: éter (R-O-R) y anillos cíclicos (C-C) a longitudes de onda entre 1100-1200 cm^{-1} (Liu et al., 2010). Los picos de absorción entre 1010-1100 cm^{-1} indicaron que las muestras contienen piranosas y furanosas; los picos a 827 cm^{-1} hacen referencia a la absorción de alfa-D-manopiranosas (Zhang et al., 2007), este pico fue menor para PMC comparado con PC. Las bandas de extensión a 1600-1630 y los picos de absorción a 1730-1760 cm^{-1} son correspondientes al estiramiento vibracional de C=O de grupos carboxílicos libres (-COOH) y metilesterificados (-COOCH₃), respectivamente (Wang et al., 2015); la

absorbancia de estas bandas varió en función al método de extracción, en donde las pectinas extraídas mediante la EC presentaron mayor absorbancia en las bandas correspondientes a grupos carboxilo esterificadas, mientras que las pectinas obtenidas por EAU presentaron las mayores bandas para grupos carboxílicos libres. Absorbancias entre 2920 – 2850 cm^{-1} fueron atribuidas al estiramiento vibracional de $-\text{CH}$ ($-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$) que incluye grupos ésteres metílicos de ácido galacturónico (Liu et al., 2010), y fueron mayores para las pectinas de toronja. A 3400 cm^{-1} aproximadamente, se presenta una banda amplia atribuida al estiramiento vibracional de grupos $-\text{OH}$ debido a enlaces inter e intramoleculares localizados en las cadenas principales del ácido galacturónico (Liang et al., 2012). Por lo anterior, el análisis indica la influencia de los métodos de extracción en la estructura química de las pectinas de cada especie.

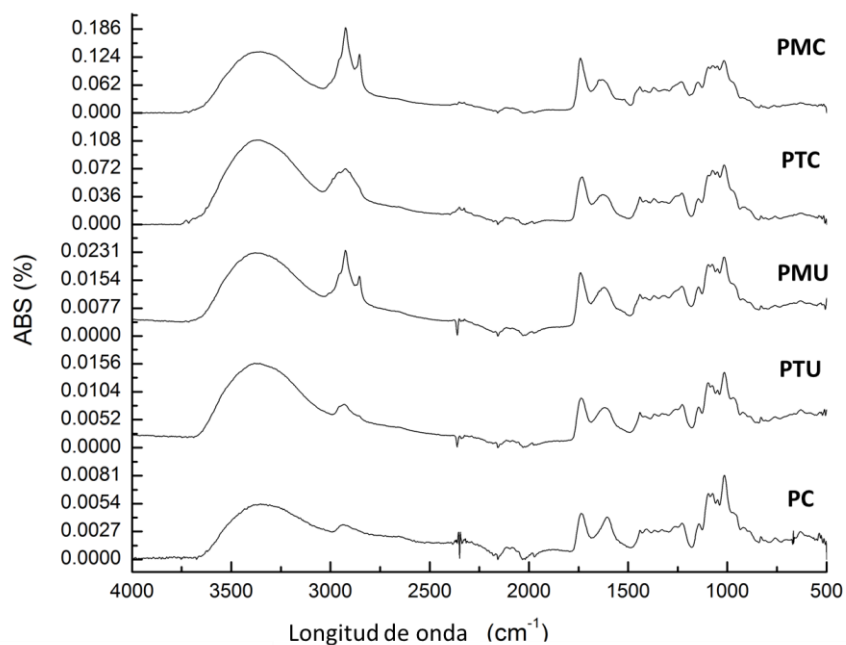


Figura 17. Espectros FTIR de pectinas cítricas.

8.3.3 Caracterización funcional

La Tabla 16 muestra los resultados de las propiedades funcionales de las pectinas extraídas. La viscosidad intrínseca (η), es útil para entender el comportamiento del polisacárido cuando se encuentra en solución, y, de esta manera, establecer la cantidad a usar durante el proceso de encapsulación. Los valores de η obtenidos en las pectinas extraídas en este trabajo fueron entre 2.45 y 4.98 dL/g; siendo mayor en las pectinas de toronja, e incluso, muy similares a la PC; esta η más alta se puede relacionar con sus propiedades estructurales. Se han reportado viscosidades para la pectina de toronja de 3.98 y 3.23 dL/g obtenidas por EC y EAU respectivamente (Bagherian et al., 2011). Tal y como establece Domínguez (2011), la viscosidad de la pectina depende del tamaño y estructura de la molécula, así como también de la temperatura, esto es, una cadena de mayor tamaño tiene mayor interacción de los grupos carboxilo con las moléculas de agua, lo cual ocasiona un aumento de la viscosidad y una disminución del volumen y/o gelificación del medio por efecto del GE.

Tabla 16. Caracterización funcional de las pectinas

| Parámetro | Pectina comercial | Método convencional | | Método ultrasonido | | |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | PT | PM | PT | PM | |
| Polifenoles mg EAG/g pect | 3.97 ± 0.97 ^b | 1.67 ± 0.59 ^c | 6.54 ± 1.02 ^a | 1.79 ± 0.44 ^c | 4.74 ± 0.22 ^{ab} | |
| Viscosidad intrínseca (dL/g) | 4.03 ± 0.04 ^b | 4.98 ± 0.06 ^a | 2.52 ± 0.02 ^c | 4.12 ± 0.05 ^b | 2.45 ± 0.02 ^c | |
| CRAg (g H ₂ O/gr pect) | 2.02 ± 0.20 ^b | 21.78 ± 1.03 ^a | 18.76 ± 1.09 ^a | 15.42 ± 3.46 ^a | 16.61 ± 4.24 ^a | |
| CRAc (g aceite/gr pect) | 1.26 ± 0.01 ^a | 1.15 ± 0.03 ^a | 1.08 ± 0.12 ^a | 1.24 ± 0.08 ^a | 1.14 ± 0.15 ^a | |
| Espumantes | % CEs | 1.75 ± 0.35 ^{bc} | 0.60 ± 0.14 ^c | 2.75 ± 0.35 ^b | 1.75 ± 0.35 ^{bc} | 9.50 ± 0.71 ^a |
| | % EEs | 55.0 ± 7.07 ^b | 91.43 ± 2.02 ^a | 81.67 ± 2.36 ^a | 77.83 ± 4.01 ^a | 81.39 ± 5.11 ^a |
| Emulsificantes | % CEm | 28.94 ± 1.00 ^{ab} | 30.24 ± 2.9 ^{ab} | 33.27 ± 3.45 ^a | 11.92 ± 0.82 ^c | 21.37 ± 2.41 ^{bc} |
| | % EEm | 64.54 ± 4.42 ^a | 52.78 ± 3.9 ^{ab} | 43.08 ± 6.53 ^{bc} | 26.61 ± 3.96 ^c | 37.09 ± 1.94 ^{bc} |

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas con respecto a p=0.05 (Tukey).

Las moléculas de pectina están reticuladas por compuestos fenólicos, los cuales están presentes en la pared celular (>2%) de plantas y sus frutos (Caffall & Mohnen, 2009), por lo que durante el proceso de extracción, se pueden adherir algunos polifenoles a los monosacáridos de la cadena de pectina; se han reportado valores de entre 7.06 ± 0.20 y 4.21 ± 0.10 μg EAG/mg para pectina de toronja por EC y EAU, respectivamente (Wang et al., 2015), 1.34% para la de manzana (Wikiera et al., 2016), y entre 3.02 y 8.40 μg EAG/mg en pectina de tejocote (*Crataegus mexicana*) (Cuevas-Bernardino et al., 2016). En las pectinas extraídas, se cuantificaron valores entre 1.67 y 6.54 mg EAG de polifenoles por g de pectina, siendo más elevados en las pectinas de mandarina (PMC= 6.54 ± 1.02 y PMU= 4.74 ± 0.22 mg EAG/g). Estos resultados coinciden con la mayor intensidad de color que estas pectinas tienen en comparación con las de toronja (Figura 16), ya que se ha comprobado que una pectina con colores intensos puede indicar la presencia de polifenoles u otros pigmentos solubles (Shaha et al., 2013), es por eso que se realizan lavados con etanol, agua u otros solventes para eliminarlos y clarificar el color de este polisacárido (Geerkens et al., 2015).

La capacidad de retención de agua (CRAg) se define como la cantidad de agua ligada por gramo de muestra, y se utiliza para definir las condiciones de almacenamiento (Bayar et al., 2018), y los posibles usos que pueda tener la pectina. Se ha reportado una CRAg de 4.84 gH₂O/g en pectina de *Opuntia ficus indica* (Bayar et al., 2017) y 3.6 gH₂O/g en pectina de níspero (Arroyo et al., 2008); mientras que en las pectinas extraídas en este trabajo, la CRAg fue elevada (entre 15.42 y 21.78 gH₂O/g), incluso significativamente mayor a la PC ($p < 0.05$), esto sugiere que se llevó a cabo una fuerte interacción entre la cadena polimérica y las moléculas de agua mediante puentes de hidrógeno, apuntando su uso como estabilizante de alimentos. Además, se observa que la EAU disminuyó a la CRAg; esto puede deberse a una modificación de la estructura de la pectina como consecuencia de la cavitación, este efecto probablemente aumentó la disponibilidad de los grupos carboxilo, para interaccionar con moléculas de agua, ya que Prajapati et al. (2013) mencionan que algunos polisacáridos son considerados con buena capacidad de hinchamiento de agua cuando poseen carboxilos libres.

En cuanto a la capacidad de retención de aceite (CRAc), esta se considera como la cantidad de un líquido grasoso fijado a un gramo de muestra, y se considera importante para la elaboración de hidrocoloides (Bayar et al., 2018). Se han reportado 0.37 g aceite/g en pectina de níspero, (Arroyo et al., 2008) mientras que (Bayar et al., 2017) reportaron que la EAU disminuye

significativamente la CRAC con respecto a la EC (de 1.24 a 1.01 g aceite/g), sin embargo, en las pectinas extraídas (incluyendo la PC) no hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre la CRAC, la cual osciló entre 1.08 y 1.26 g aceite/g de pectina, considerándose bajos en comparación con otros ingredientes alimentarios, esto probablemente puede deberse a su bajo contenido proteico anteriormente mencionado (Tabla 14), ya que la CRAC está en función de las interacciones hidrofóbicas por efecto de algunas proteínas (Badui, 2006).

De igual manera se analizaron otras propiedades funcionales que pueden definir usos específicos de las pectinas extraídas, tal es el caso de las propiedades espumantes y emulsificantes.

La Capacidad Espumante (CEs) se expresa como el porcentaje de volumen (espuma) que se incrementa en una solución (Granados et al., 2014) debido a la dispersión de burbujas de gas en agua. Se observó que la CEs fue mayor en las pectinas de mandarina (Tabla 16), lo cual estuvo influenciado por una mayor cantidad de proteína en estas muestras, ya que estas moléculas ayudan a la formación y estabilización de la fase gaseosa dispersa debido a su actividad superficial (Badui, 2006). Sin embargo, la baja CEs en las pectinas extraídas (<10%) en este trabajo, incluyendo la PC, se debe a que estos polisacáridos tienen una baja tendencia a adsorber en la interfaz aire-agua, lo que reduce la capacidad de formación de espuma, pero aumenta la viscosidad y la estabilidad de la espuma (Bayar et al., 2016) tal y como se observa en la Figura 18A (EEs>80%), por lo que podrían utilizarse como coadyuvantes de compuestos tensioactivos para mantener su EEs.

En cuanto a la Capacidad Emulsificante (CEm), esta se define como la cantidad de aceite que es susceptible a ser emulsionado por una cantidad dada de muestra antes que se invierta la emulsión (Angarita & González, 2005). Este parámetro fue mayor en las pectinas de mandarina, ya que estas contienen una mayor cantidad de proteína que las de toronja, siendo la proteína ligada a la estructura de la pectina la responsable de la propiedad tecno-funcional (Leroux et al., 2003), aunque también existen otros factores que contribuyen a la formación y estabilización de la emulsión, como una alta cantidad de polifenoles (Wikiera et al., 2016) y la presencia de monosacáridos como arabinosa y galactosa (Chen et al., 2016). Sin embargo, la estabilidad emulsificante no fue igual o mayor para las pectinas extraídas con respecto al control (PC) (Figura 18B), ya que su EEm fue <50% y presentaron el fenómeno de cremación, estos

resultados pudieron deberse a la concentración del emulgente (pectina) y su viscosidad (Kosegarten-Conde & Jiménez-Munguía, 2012), así como a la temperatura a la que se elaboró la emulsión (80°C); Ma et al. (2013) indicaron que la EEm es mayor a bajas temperaturas; por lo tanto, no se recomienda su uso para estabilizar sistemas con moléculas hidrofóbicas.

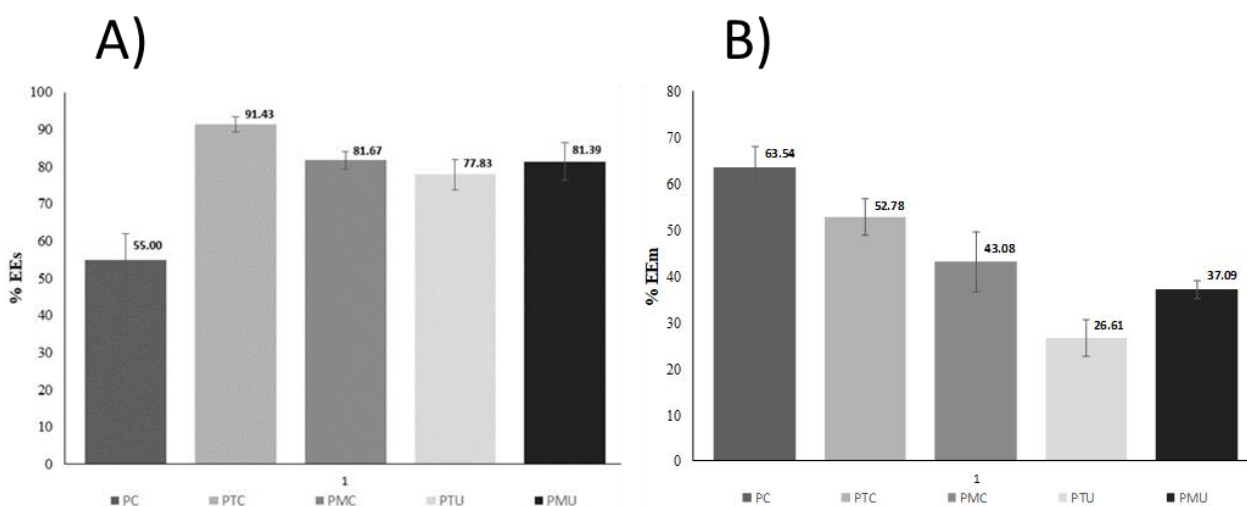


Figura 18. Propiedades funcionales de las pectinas cítricas: Estabilidad espumante (A) y Estabilidad emulsificante (B)

El efecto de la solubilidad de las pectinas cítricas en diferentes solventes, pHs y temperaturas se muestra en la Tabla 17. La pectina debe presentar una solubilidad que permita su completa solubilización cuando se encuentre en disolución, es por eso que la PC pasa por un proceso que asegure esta propiedad funcional. En las pectinas de toronja, especialmente PTC, se observó la solubilidad más alta, ya que la PTU requiere de temperatura elevada y disminuir el pH para lograr la completa solubilización; mientras que las pectinas de mandarina presentaron la solubilidad más baja, e incluso fueron parcialmente insolubles, este resultado puede deberse al alto contenido de cenizas que presentan estas pectinas con respecto a las de toronja (Tabla 14); esto es, el alto contenido de iones divalentes como el Ca^{2+} pueden estar formando pectatos; otro posible factor que influye en la solubilidad de éstas pectinas de mandarina, es el efecto que tiene el secado, pues es un hecho de que la temperatura contribuye a la caramelización de los azúcares,

a la formación de compuesto aromáticos y pardeamiento no enzimático debido a reacciones de Maillard entre los azúcares y las proteínas presentes, y finalmente a la oxidación de fenoles, todos estos compuestos difíciles de solubilizar.

De las propiedades funcionales, cabe destacar que tanto la CRAg como la viscosidad pueden influir en el proceso de encapsulación, ya que el sistema que se forma ocurre en un ambiente acuoso y no hidrofóbico. Sin embargo, el contenido de polifenoles puede contribuir en la actividad antioxidante del sistema.

Tabla 17. Solubilidad de pectinas citricas

| Solvente | PC | PTC | PMC | PTU | PMU |
|---------------|---|--|--|--|---|
| Agua Fría | Totalmente soluble. Estable. Ligeramente turbio/opaco. Sin precipitado. Solución homogénea. | Totalmente soluble. Turbio ligero. Con ligero precipitado blanco. | Parcialmente soluble. Turbidez. Color amarillento. Precipitado ligero y pequeñas partículas. | Partículas suspendidas. Precipitado blanco abundante. Turbidez. | Parcialmente soluble. Turbia. Color amarillo. Precipitado con partículas amarillas en gran proporción. |
| Agua Caliente | Totalmente soluble. Traslucida | Totalmente soluble. Turbio ligeramente. | Parcialmente soluble. Precipitado ligero. Color amarillo turbio. | Parcialmente soluble. Turbio. Ligero precipitado. Suspensión heterogénea. | Parcialmente soluble. Precipitado abundante. Amarillo turbio. |
| NaOH Frio | Totalmente soluble. Color amarillo. Traslucido ligero. | Totalmente soluble. Color ligeramente amarillo. Traslucido. | Partículas suspendidas. Color amarillo. Sin precipitado. | Totalmente soluble. Color amarillo ligero. Traslucida. Suspensión. | Parcialmente soluble. Color amarillo. Precipitado amarillo ligero. |
| NaOH Caliente | Totalmente soluble. Color amarillo Traslucido ligero. | Totalmente soluble. Color amarillo. Traslucido. | Parcialmente soluble. Turbio color amarillo. Con precipitado abundante. | Totalmente soluble. Traslucido. Color amarillo. Suspensión. | Parcialmente soluble. Color amarillo turbio. Con partículas suspendidas. Sin precipitado. |

8.3.4 Características reológicas

8.3.4.1 Curvas de flujo

El comportamiento reológico de las soluciones de pectina se evaluó mediante las curvas de flujo de la viscosidad aparente (η) al aumentar la tasa de corte (λ). En la Figura 19 se muestra el efecto que tiene cada una de las curvas de flujo de las soluciones de pectina al 1 y 2 % (p/v); en ambas se observa que el comportamiento que presenta cada una de las pectinas extraídas es similar independientemente de la concentración, y se trata de un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento no newtoniano. Se han reportado resultado similares para pectina de toronja (Wang et al., 2016). Este comportamiento repercute en una variación de la viscosidad aparente, de hecho, se ha comprobado que la viscosidad de soluciones de pectina disminuye rápidamente conforme se diluye (Cuevas-Bernardino et al., 2016).

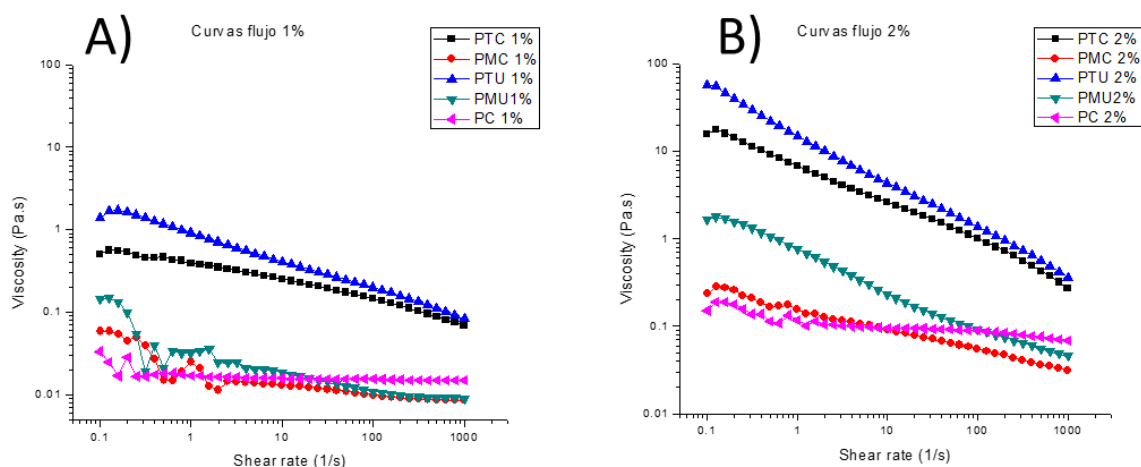


Figura 19. Curvas de flujo de soluciones de pectina: A) Soluciones 1% B) Soluciones 2%.

En cuanto a efecto que tiene la fuente y/o tipo de pectina en la viscosidad aparente de las soluciones de estos polímeros, se observó un comportamiento similar al observado en la Tabla 15 con la viscosidad intrínseca; ya que las soluciones que contienen las pectinas de toronja muestran una mayor viscosidad aparente a cualquier tasa de corte dada, esto se debe a que la viscosidad está influenciada por el PMol de la pectina, por lo que, cuanto mayor es el PMol, mayor será la viscosidad; sin embargo se debe tener en cuenta que el grado de esterificación

(Migliori et al., 2010), el número de grupos laterales reactivos y las condiciones iónicas también juegan un papel importante en la viscosidad de las pectinas (Yuliarti et al., 2015).

Las curvas de flujo de ajustaron al modelo de Carreau-Yasuda (Tabla 18), el cual se considera un modelo independiente de tiempo (Carrasco Venegas, Castañeda Pérez, & Altamirano Oncoy, 2015), y se representa de la siguiente manera:

$$\eta = (\eta_0 - \eta_\infty) [1 + (\lambda\dot{\gamma})^a]^{\frac{n-1}{a}} + \eta_\infty \dots \dots \quad \text{Ec. 1}$$

donde:

η_0 : corresponde a la viscosidad newtoniana a valores de rapidez de deformación bajos.

η_∞ : es la viscosidad newtoniana para valores de rapidez de deformación altos.

λ : es una constante de tiempo.

n : corresponde al parámetro del modelo de ley de potencias.

a : es una constante adimensional.

Tabla 18. Parametros de modelo para las curvas de flujo

| Pectina | η_0 (Pas) | λ (s) | ρ | r^2 |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PC | 0.121 | 44.639 | -0.365 | 0.749 |
| PTC | 0.557 | 2.430 | 0.830 | 0.999 |
| 1% PMC | 0.059 | 2.485 | -88.216 | 0.720 |
| PTU | 1.392 | 5.119 | 0.667 | 0.998 |
| PMU | 0.229 | 27.929 | 0.286 | 0.833 |
| PC | 2.125 | 1.46E-10 | -4.669 | 0.896 |
| PTC | 17.753 | 8.034 | 0.608 | 0.999 |
| 2% PMC | 0.225 | 3.990 | 0.756 | 0.985 |
| PTU | 1.59E+19 | 5.54E+17 | 0.248 | 0.998 |
| PMU | 1.505 | 3.676 | 0.463 | 0.999 |

El índice de consistencia (λ) complementa la información de las curvas de flujo, ya que valores elevados en mayores concentraciones de pectina permiten deducir un aumento en la viscosidad de las soluciones. Y como consecuencia, al disminuir la viscosidad, el índice de comportamiento (ρ) es <1 , por lo que se reafirma que se trata de un comportamiento no newtoniano pseudoplástico (Wang et al., 2016), el cual se debe al desenredo de la red del polímero y la orientación parcial de la cadena en la dirección del flujo de corte (Kumbar et al., 2017).

8.3.4.2 Curvas de frecuencia

Se realizaron barridos de frecuencia oscilatoria para las pectinas extraídas, incluyendo la PC, con el fin de estudiar sus propiedades viscoelásticas. Se observa en la Figura 20 que los módulos G' y G'' de las soluciones de pectina extraídas al 1% aumentaron al incrementar la frecuencia angular, mientras que las soluciones al 2% presentan un comportamiento menos notorio, esto debido a la dependencia que tiene una concentración apropiada de pectina para observar su comportamiento reológico. Una concentración menor de pectina en las soluciones (1%) genera un comportamiento viscoso, debido a que las curvas oscilatorias ($G'-G''$) son <1 , esto probablemente se debe a que la concentración del polisacárido es adecuada para que los grupos carboxilos esterificados interaccionen con las moléculas de agua y formen redes similares a las de un gel. Mientras que al incrementar la concentración de las soluciones de pectina se observa que la relación entre los módulos $G'-G''$ es ~ 1 , indicando un comportamiento viscoelástico, debido a que la viscosidad aumenta considerablemente y por lo tanto la reología de la solución se modifica.

8.4 Caracterización del extracto acuoso de estevia

Una vez que se obtuvo el extracto acuoso de las hojas de estevia, se procedió a identificar y cuantificar el perfil de polifenoles, así como la actividad antioxidante que presentaron de manera individual y en conjunto.

8.4.1 Cuantificación e identificación del contenido de polifenoles totales

La Tabla 19 muestra el contenido total de polifenoles (CPT) del extracto de estevia. El método espectrofotométrico, como el cromatográfico permitieron cuantificar la misma cantidad de CPT en el extracto (entre 87-96 mg/g bs estevia); para fines comparativos y usos posteriores del extracto se utilizó el resultado obtenido mediante cromatografía.

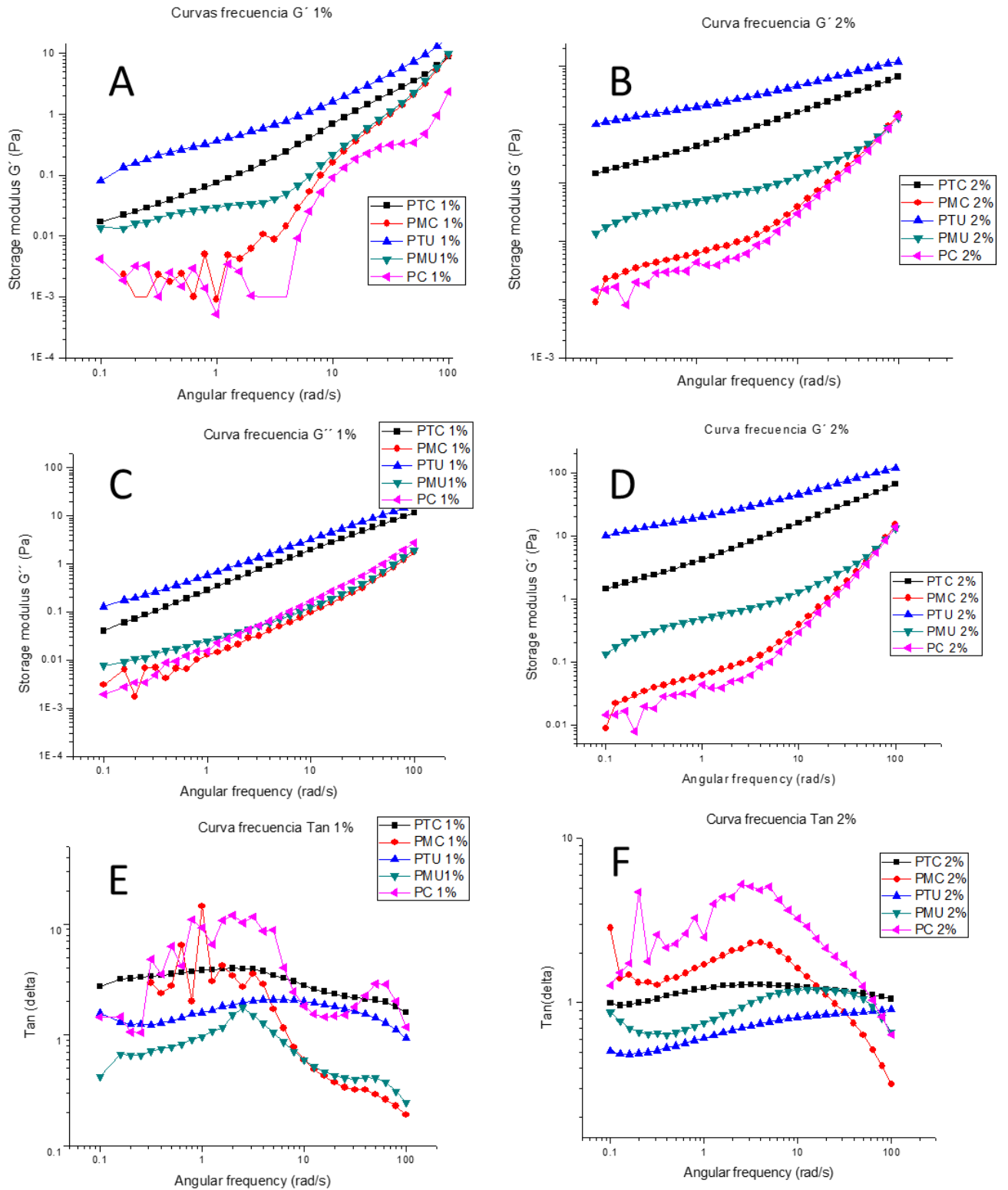


Figura 20. Curvas de frecuencia de soluciones de pectina.
 A: G' 1%, B: G' 2%, C: G'' 1%, D: G'' 2%, E: Tangente 1%, F: Tangente 2%.

Tabla 19. Identificación y cuantificación de CPT en el extracto de estevia

| Método | Compuesto fenólico | mg/g bs |
|---------------------|--------------------|-------------------------|
| UPLC | Ácido Clorogénico | 22.21±3.36 |
| UPLC | Ácido Cafeíco | 2.71±0.22 |
| UPLC | Rutina | 3.36±0.63 |
| UPLC | Ácido Elágico | 6.80±0.08 |
| UPLC | Ácido Ferúlico | 1.35±0.14 |
| PLC | Diosmina | 60.25±9.38 |
| Cromatográfico | CPT | 96.71±9.74 ^a |
| Espectrofotométrico | CPT | 87.89±1.63 ^a |

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes entre filas indican diferencias estadísticas significativas con respecto a p=0.05 (prueba de LSD).

El contenido de polifenoles en el extracto fue de 96.71 mg/g de hojas de estevia bs, siendo un resultado mayor a los reportados por Shukla et al. (2012) de 56.74 mgEAG/g (extracto etanólico, temp. ambiente) y Periche et al. (2012) de ~70 mgEAG/g (extracto acuoso, 50° C, 1:100 p/v), en donde se observa que el solvente usado (polaridad de extracción) influye directamente en el CPT; de hecho, Covarrubias-Cárdenas et al. (2018) reportan una mayor extracción de polifenoles de la harina de estevia utilizando la EAU. La concentración de polifenoles en los extractos acuosos de estevia obtenidos en este trabajo, son superiores a lo reportado en otras fuentes vegetales: piel de uva 53.6±0.4 mg/g (Sri et al., 2013), cáscara de arándanos *Vaccinium spp.* entre 25.09-69.87 mg/g (Wang et al., 2012), cacao 12.97 mg/g (Valadez-Carmona et al., 2018), remolacha 17.03 mg/g (Chen et al., 2015) y hojas de manzanilla 19.07±0.5 mg/g (Harbourne et al., 2009).

Los compuestos fenólicos del extracto de estevia se identificaron en función de sus tiempos de retención y se cuantificaron de acuerdo con sus respectivas curvas de calibración. La Figura 21 muestra el perfil polifenólico obtenido mediante UPLC, en donde se observa la presencia de diez compuestos, de los cuales fueron identificados seis.

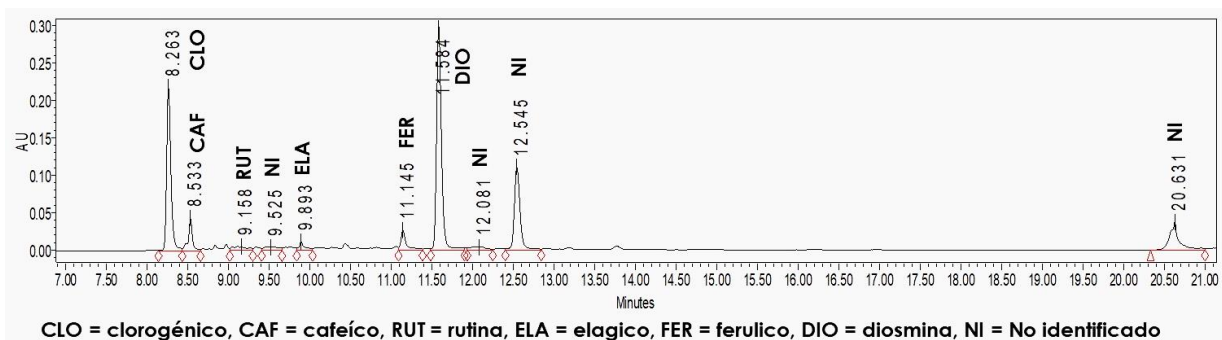


Figura 21. Cromatograma del perfil polifenólico del extracto de estevia

Reportes previos de compuestos fenólicos en extractos de estevia han identificado diferentes moléculas dependiendo del método de extracción: Yu et al. (2017) en un extracto acuoso (10% p/v a ebullición/5 min seguido de maceración/24 h) determinaron la presencia de ácido vanílico, protocatequico, cafeico, clorogénico y criptoclorogénico; Muanda et al. (2011) con un mezcla de metanol-agua (1:2 p/v por hidrodestilación/5 h) identificaron ácido gálico, cinámico, protocatequico, clorogénico, cumárico, rutina, catequina, quercetina y apigenina; Ciulu et al. (2017) usando etanol al 50% con una extracción de líquidos presurizados (4 g/25 mL a 200° C/15 min) identificaron al ácido quínico, cafeico, rutina y kanferol; Lemus-Mondaca et al. (2016) encontraron ácido clorogénico, cafeico, trans-ferulico y rutina en un extracto metanólico (0.5 g/20 mL, maceración por 24 h); además existen reportes de la presencia principalmente de ácidos hidroxicinámicos (ferulico, cumárico, cafeico, sinápico y clorogénico); adicionalmente, Pacifico et al. (2019) reportaron que durante una extracción etanólica (3 g/40 mL mediante maceración asistida por sonicación) se pueden fragmentar los compuestos fenólicos del extracto de estevia a trans-isómeros de ácidos quínico-cafeico y glucósidos de quercetina-kanferol. De lo anterior, se concluye que el ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferulico, la rutina y la quercetina son los polifenoles que se pueden encontrar comúnmente en extractos de estevia, y, de los cuales, los cuatro primeros fueron identificados en el extracto analizado. Es importante mencionar que la diversidad de compuestos polifenólicos en estevia es producto de factores controlables como: 1) las condiciones de extracción (principalmente la polaridad del solvente usado), teniendo una mayor extracción de polifenoles en medio acuoso; Ciulu et al. (2017) mencionan que los compuestos polares constituyen el grupo predominante en la estevia; y 2) el tratamiento post-cosecha de la estevia, ya que Lemus-Mondaca et al. (2016) reportaron que la

temperatura de secado de la estevia tiene un efecto significativo en la cantidad de compuestos fenólicos identificados.

El ácido clorogénico y la diosmina fueron los compuestos mayoritarios identificados en el extracto de estevia con 22.21 y 60.25 mg/g de polvo respectivamente (Tabla 19); en el caso del ácido clorogénico, un compuesto fenólico formado por la esterificación de ácidos cinámicos (Figura 22A) (Farah et al., 2008), ha sido reportado como uno de los compuestos fenólicos más abundantes de la estevia, de hecho, Lemus-Mondaca et al. (2016) cuantificaron 15.36 mg de este compuesto por g de estevia, mientras que Muanda et al. (2011) del CPT en un extracto metanol-agua reportaron 0.32 mg/mL de ácido clorogénico. Esta reportado que este compuesto tiene actividad anti-edematogénica, anti-inflamatoria, antinociceptiva (Dos Santos et al., 2006), antibacteriana (Fu et al., 2017), antidiabética (Oboh et al., 2015) y antioxidante (Hwang et al., 2017).

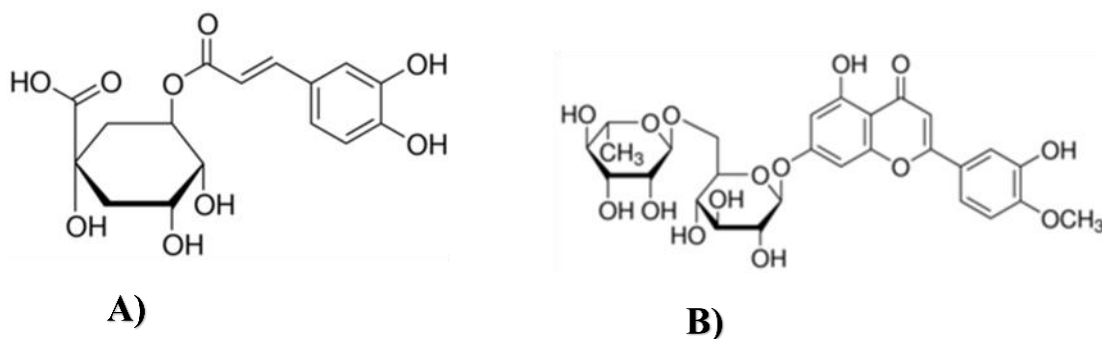


Figura 22. Polifenoles indentificados en el EAS: A) ácido clorogénico, B) diosmina.

En cuanto a la diosmina, un flavonoide glucosilado encontrado principalmente en los cítricos (Figura 22B), se le atribuyen actividades biológicas similares a las del ácido clorogénico que incluyen su efecto antihiper glucemiante, anti-peroxidación de lípidos, antiinflamatorio, antimutagénico, antihipertensivo y antioxidante (Silambarasan & Raja, 2012). Esta última, la antioxidante, es un efecto que muestran ambos compuestos, y que puede contribuir de manera individual o en conjunto a la actividad antioxidante del extracto acuoso de estevia; lo que se traduce en beneficios para la salud con el consumo de esta planta para la prevención de enfermedades. De hecho, existen reportes de que tanto el ácido clorogénico como la diosmina

pueden ser candidatos para el tratamiento de lesiones cerebrales como el Alzheimer (Shabani & Ali Mirshekar, 2018).

8.4.2 Determinación de la actividad antioxidante

La Tabla 20 muestra la actividad antioxidante (%AA) del extracto acuoso de estevia (EAS) obtenida usando tres ensayos: DPPH•, ABTS• y FRAP; además se utilizaron como referencia compuestos fenólicos a la concentración que se cuantificaron en los extractos de estevia: ácido clorogénico, diosmina, y BHT, así como un extracto de estevia obtenido mediante EAU (ESEAU) (Covarrubias-Cárdenas et al., 2018); esto con el fin de comparar la actividad antioxidante. Se ha reportado que *Stevia rebaudiana* tiene una actividad antioxidante entre 10-90% (Celaya et al., 2012); mientras que Kim et al. (2011) y Shukla et al. (2012) han reportado que el extracto acuoso puede inhibir de 40 a 72.37 % al radical DPPH•, el cual, al tener un electrón desapareado es reducido por una especie antioxidante (Brand-Williams et al., 1995) como las identificadas en el extracto de estevia (Tabla 19). Se ha comprobado que el %AA de los métodos DPPH y ABTS esta correlacionada con el contenido de polifenoles (Ramos et al., 2008), lo que puede observarse en la AA de los extractos de estevia y el ácido clorogénico. Estas diferencias entre los ensayos probados sugieren que los compuestos antioxidantes del extracto de estevia tienen distintas vías y diferente capacidad para inhibir los radicales libres que reducen al DPPH• y ABTS•, así como al cloruro férrico (FRAP).

Tabla 20. Actividad antioxidante del extracto de estevia

| Muestra | % Actividad antioxidante | | mg Trolox/g de muestra | | |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | %DPPH• | % ABTS• | DPPH• | ABTS• | FRAP |
| Extracto estevia | 75.00±1.46 ^b | 91.78±0.32 ^{b^a} | 3.95±0.08 ^c | 10.50±0.04 ^c | 24.73±0.6 ^b |
| Extracto estevia ^{***} | 92.68±0.22 ^a | 96.80±0.16 ^a | 27.3±0.07 ^c | 61.25±0.1 ^c | 157.72±6.4 ^b |
| Ác. Clorogénico | 77.07±0.29 ^b | 83.84±0.08 ^b | 281.13±0.9 ^b | 627.08±0.6 ^b | 6363.6±218 ^a |
| Diosmina | 4.82±1.68 ^c | 14.15±3.06 ^c | 16.32±1.8 ^c | 39.44±7.4 ^c | 0.50±0.02 ^b |
| BHT | 4.14±1.46 ^c | 41.61±2.34 ^c | 374.40±37.7 ^a | 2550±136.7 ^a | 77.45±10.7 ^b |

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes entre filas indican diferencias estadísticas significativas con respecto a p=0.05 (Tukey).

*** Extracto de estevia de referencia obtenido mediante EAU (Covarrubias-Cárdenas et al., 2018)

El ESEAU mostró valores de equivalentes de Trolox superiores al EAS, estos resultados sugieren que el método con el que se obtuvo el de referencia (ESEAU) permitió una mayor extracción de compuestos fenólicos, los cuales contribuyeron a esta actividad biológica. Con respecto a los estándares analizados, el BHT presentó la mayor concentración de Trolox en los ensayos ABTS y DPPH, seguido del ácido clorogénico, el cual presenta un %AA ligeramente inferior al del extracto; mientras que la diosmina presentó los valores de equivalentes de Trolox más bajos de los 3 estándares, pero superiores al extracto de estevia. Sin embargo, a pesar de la baja concentración de EAS su actividad antioxidante es superior a la diosmina y BHT y similar a la del ácido clorogénico. Estos resultados sugieren la potencia antioxidante de estos extractos y una posible sinergia de los compuestos fenólicos.

8.4.3 Caracterización de las fracciones del extracto

8.4.3.1 Método 1

Se utilizaron dos métodos para la separación cromatográfica de los extractos acuosos de estevia. La Figura 23 muestra el cromatograma de las fracciones recuperadas con el método 1.

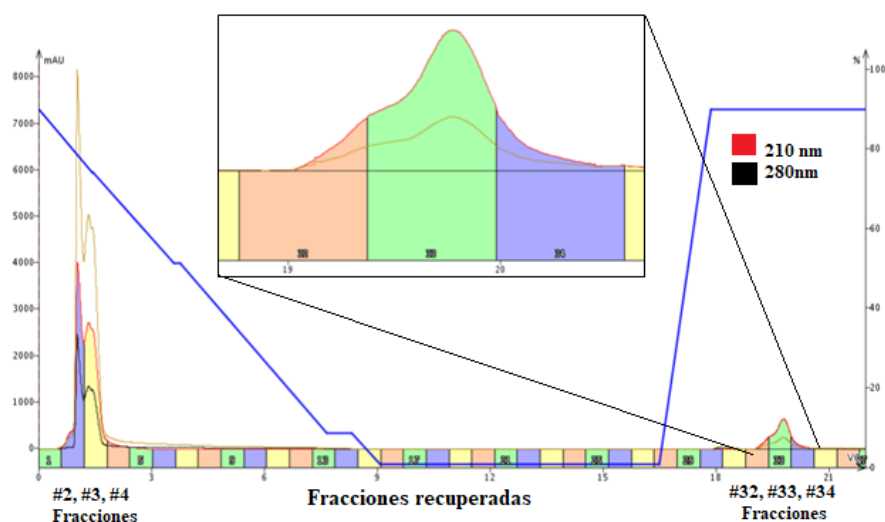


Figura 23. Cromatograma de fracciones recuperadas del extracto de estevia: Metodo 1.

Los picos con bordes de color rojo indican lecturas de absorción a 210nm, mientras que los picos con bordes de color negro indican compuestos detectados a 280nm. Se recuperaron seis fracciones: 3 cuya señal se detectó a 280nm (2, 3 y 4) y otras 3 cuya señal se detectó a 210nm

(32, 33 y 34); estas últimas, la coloración fue similar a la del extracto de estevia, por lo que pudo haber ocurrido una co-elución de compuestos detectables a esta longitud de onda, y que corresponden probablemente a compuestos orgánicos presentes en la planta como algunos pigmentos o compuestos fenólicos. De hecho, resultados previos (datos no mostrados) permitieron identificar en estas primeras fracciones al ácido clorogénico y caféico mediante cromatografía de capa fina, los cuales también aparecieron en el extracto mediante UPLC.

En cuanto al %AA de las fracciones, esta fue determinada mediante el ensayo ABTS•, el cual fue elegido debido a la facilidad que tienen este radical para ser reducido por compuestos antioxidantes; además, puede utilizarse para muestras hidro o liposolubles (Re et al., 1999). La Tabla 21 muestra los resultados de este ensayo, en donde las primeras fracciones 2 y 3 presentan la mayor actividad antioxidante (~95%) con respecto a las restantes, lo que sugiere la presencia de los compuestos fenólicos en ellas, y que fueron eluidas con el metanol por tener una polaridad similar a este solvente.

Tabla 21. Actividad antioxidante de fracciones cromatográficas

| Numero de fracción | Longitud de onda detectada | %AA ABTS |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 2 | 280nm | 96.43 ± 0.18 ^a |
| 3 | 280nm | 95.79 ± 0.00 ^a |
| 4 | 280nm | 34.90 ± 8.14 ^b |
| 32 | 210nm | 2.05 ± 0.24 ^c |
| 33 | 210nm | 4.65 ± 2.04 ^c |
| 34 | 210nm | 6.70 ± 10.25 ^c |

Letras minúsculas distintas entre filas indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

El segundo grupo de fracciones (32-34) presentó una actividad antioxidante muy baja, por lo que se presume que posiblemente los compuestos detectados a 210 nm no pertenezcan a compuestos fenólicos, si no a glucósidos de esteviol, ya que Morlock et al. (2014) han reportado que en un rango de longitud de onda UV entre 200-210 nm se obtienen picos de absorbancia de los glucósidos de esteviol. Se ha reportado que algunos de estos compuestos guardan una

relación directa entre la actividad antioxidante, como es el caso del esteviósidos y rebaudiosido A (Tavarini et al., 2010). Para poder confirmar las suposiciones realizadas acerca de las fracciones recuperadas en la separación cromatográfica, es necesario realizar una caracterización (que incluya tiempos de retención, espectros de absorción, peso molecular, entre otras) a los compuestos detectados, con el fin de compararlos tanto con estándares de esteviósidos como de compuestos fenólicos.

8.4.3.2 Método 2

La separación cromatográfica del extracto de estevia con el método 2 se presenta en la Figura 24, en donde se observa que este método permitió una mejor separación de los compuestos presentes, ya que se observan tres picos definidos que representan tres fracciones (11, 16 y 35) todas ellas a 280nm; cada una de estas fracciones fueron procesadas para su identificación mediante UPLC.

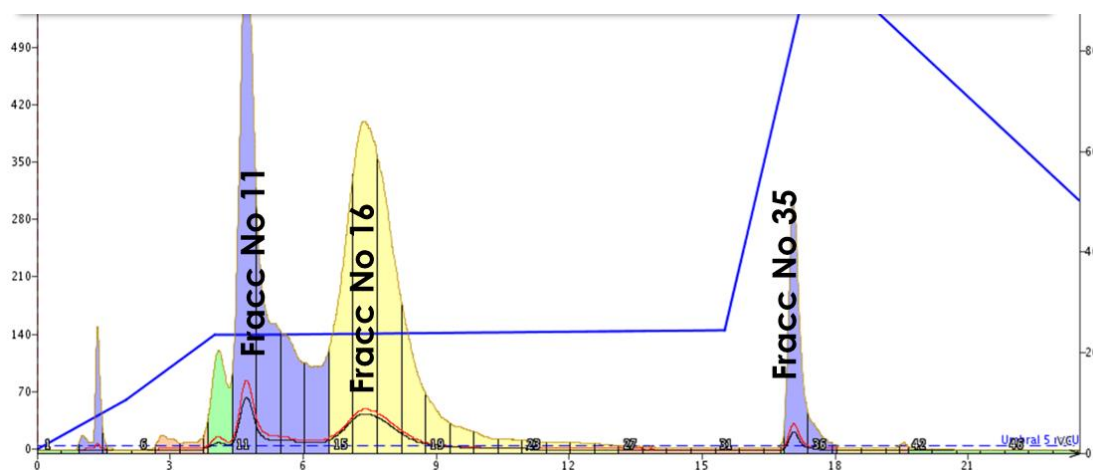


Figura 24. Cromatograma de fracciones recuperadas del extracto de estevia: Metodo 2.

En la fracción 11 (Tabla 22), se identificó ácido caféico (12.73 ppm) y clorogénico (80.95 ppm), este último, en mayor proporción (74.31%), el cual fue identificado previamente en el extracto de estevia y en las fracciones recuperadas por el método 1. También se observó la presencia de 3 compuestos desconocidos no identificados, los cuales representaron en conjunto un 11.67% de esta fracción. En la fracción 16, se identificó el ácido ferúlico (1.21 ppm) y la diosmina (114.01 ppm), la cual se encontró en mayor proporción (65.94%). El compuesto identificado

como desconocido 1 representa un 30.55% de esta fracción. La fracción 35 no mostró ningún compuesto fenólico, a pesar de que en el cromatograma (Figura 25) se muestra una señal considerable. Este resultado, puede deberse probablemente a que alguno o varios de los seis polifenoles identificados en el extracto de estevia sufrieron modificaciones que generaron productos de degradación, modificándose su tiempo de retención y pico de absorción, dificultado su identificación.

Tabla 22. Compuestos fenólicos identificados en fracciones del extracto de estevia.

| Número de fracción | % de compuesto en cada fracción | | | | | | | | | %AA de la fracción |
|--------------------|---------------------------------|---------|--------|----------|----------|----------|---------------|---------------|---------------|--------------------|
| | Clorogénico | Caféico | Rutina | Elálgico | Ferúlico | Diosmina | Desconocido 1 | Desconocido 2 | Desconocido 3 | |
| 11 | 74.31 | 14.02 | ND | ND | ND | ND | 2.54 | 5.43 | 3.70 | 56.67±6.75 |
| 16 | ND | ND | ND | ND | 3.51 | 65.94 | 30.55 | ND | ND | 37.12±1.75 |
| 35 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 100 | ND | ND | ND |

ND = No detectado

En cuanto a la actividad antioxidante de las fracciones, la número 11 mostró el mayor %AA (Tabla 22), lo cual puede deberse a la presencia ácido clorogénico en esta fracción sugiriendo que este compuesto es el de mayor contribución en la actividad antioxidante de la estevia (Farah et al., 2008). La fracción 16 mostró un %AA menor, sugiriendo que el ácido ferúlico, la diosmina y el compuesto desconocido 1, contribuyen en menor proporción a la actividad antioxidante.

8.5 Encapsulación del extracto acuoso de estevia

Los rendimientos de encapsulación (%R-cap) de los distintos polvos obtenidos con las pectinas cítricas oscilaron alrededor del 90%, con excepción del tratamiento CC, que corresponde a la pectina de toronja extraída por el método convencional (PTC), el cual fue de 68% (Tabla 23); sin embargo, los rendimientos más bajos se obtuvieron con el tratamiento LL que corresponde al polvo del extracto de estevia con pectina cítrica (0.2% p/v). Se puede observar que los rendimientos (%R-cap) estuvieron en función de la cantidad de sólidos totales en la suspensión

a encapsular, y de igual manera, la combinación de materiales de envoltura y la cantidad proporcionaron un incremento en la eficiencia de encapsulación (%Ef-cap) en los polvos, es por eso que se recomienda que el material de pared se encuentre entre el 10 y el 30% en el sistema (Faridi et al., 2017; Ghasemi et al., 2018; Pereira et al., 2017).

Tabla 23. Rendimientos de microencapsulación del extracto de estevia

| Clave | Descripción | % R-cap | % Ef-cap | % Ef-lib |
|-----------|---------------|---------|-----------------------------|---------------------------|
| AA | PTC | 89.65 | 92.63 ± 0.77 ^{ab} | 5.79 ± 0.28 ^c |
| BB | PMC | 89.59 | 94.45 ± 0.77 ^a | 3.66 ± 0.68 ^d |
| CC | PTU | 68.27 | 89.54 ± 0.25 ^{cd} | 2.94 ± 0.00 ^d |
| DD | PMU | 89.07 | 93.00 ± 0.51 ^{ab} | 3.23 ± 0.28 ^d |
| Controles | | | | |
| EE | PC | 89.06 | 90.00 ± 0.12 ^{abc} | 3.49 ± 0.56 ^d |
| FF | Blanco | 70.40 | ND | ND |
| GG | Capsul | 84.64 | 92.00 ± 0.38 ^{abc} | ND |
| HH | Sn/pect | 84.64 | 89.18 ± 0.51 ^d | ND |
| II | Estevia | 21.91 | ND | ND |
| KK | Goma Arabiga | 79.37 | 80.90 ± 1.15 ^e | 14.94 ± 2.22 ^b |
| LL | Pectina + ES* | 12.50 | 14.54 ± 4.75 ^f | 93.75 ± 6.19 ^a |

*ES= Extracto de estevia. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadística significativa entre filas (Tuckey, p<0.05). ND= No determinado.

La concentración de pectina de toronja y mandarina utilizada para la encapsulación de los extractos acuosos de estevia, se determinó haciendo varias pruebas preliminares utilizando solo estos dos materiales, ya que se detectó que a concentraciones del 1% (p/v) de este carbohidrato, se formaron geles. Estos resultados probablemente se debieron al pH ligeramente ácido de los extractos y a la presencia de minerales divalentes los cuales posiblemente estén interaccionando con los grupos carboxilo libres formando pectatos. Esta reportado que las hojas de estevia tienen altas concentraciones de Ca²⁺ (Gasmalla et al., 2014; Kaushik et al., 2010).

.Trabajos previos reportan el uso de concentraciones bajas de pectina (Faridi et al., 2017; Noello et al., 2016; Tamm et al., 2016) en combinación con otros agentes encapsulantes como proteína y gomas para procesos de encapsulación, aumentando el %R-cap, pues como se observa en la Tabla 23, el tratamiento LL, que solo contenía pectina comercial y el extracto acuoso de estevia presentó los resultados más bajos: %R-cap del 12.50% y una Ef-cap del 14.54%.

8.5.1 Eficiencia de encapsulación (%Ef-cap)

Los resultados del %Ef-cap de las pectinas cítricas fue aproximadamente del 90% (Tabla 23). El análisis estadístico de diseño arrojó que el tipo de pectina es el principal factor que afecta significativamente la %Ef-cap (Anexo 5), seguido del método de extracción.

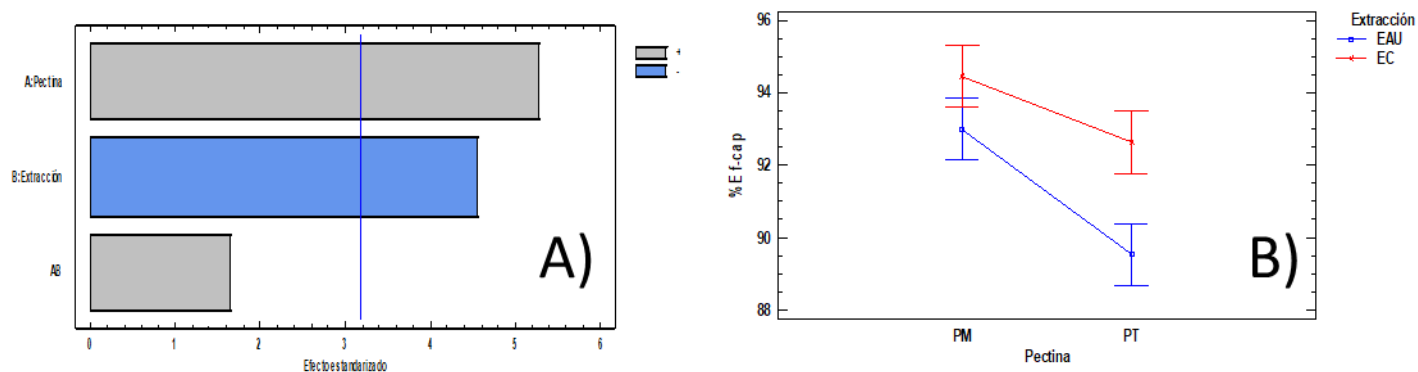


Figura 25. Efecto del tipo de pectina y método de extracción en la encapsulación de extractos acuosos de estevia: A) Diagrama de Pareto de factores significativos, B) Gráfico de interacciones de los factores evaluados.

En la Figura 25A se observa que el método de extracción para obtener la pectina, influye significativamente en el %Ef-cap de los compuestos fenólicos de la estevia, siendo la EC el método que tiene un mayor potencial como agente encapsulante (Figura 25B); estos resultados pueden deberse a la modificación de la estructura de la pectina por efecto de la cavitación en el ultrasonido (Muñoz-Almagro et al., 2017), ya que se afectan de manera negativa sus propiedades tecnofuncionales y posiblemente, por la pérdida de grupos funcionales, se dificulte la unión del ácido galacturónico con otras biomoléculas. También está reportado que puede

influir en las propiedades de la pectina, el solvente utilizado para su extracción (Mierczynska, Cybulska, & Zdunek, 2017).

El análisis estadístico de componentes principales (Figura 25A) también arrojó que la fuente de pectina afecta significativamente la Ef-cap, siendo las pectinas de mandarina las que tuvieron la mayor capacidad encapsulante de los polifenoles de estevia con respecto a las de toronja, pues logran retener una mayor cantidad de compuestos fenólicos. Este hecho sugiere que probablemente el uso de pectinas de menor tamaño en la encapsulación de polifenoles puede ser una ventaja para mejorar la estabilidad física y química de la cápsula formada, tal y como ocurrió con las pectinas de mandarina, que tiene un PMol bajo (Tabla 16). Mierczynska et al. (2017) comprobaron que algunas propiedades químicas y reológicas de las pectinas difieren según la fuente de extracción. Por lo que el mejor tratamiento para la encapsulación de compuestos fenólicos del extracto acuoso de estevia resultó el tratamiento BB (PMC obtenida por EC, proteína de chícharo, GA y ES) con una Ef-cap del 94.45%.

El efecto encapsulante que tienen las pectinas cítricas extraídas fue comparado con controles positivos y negativos, eligiendo al tratamiento BB para este fin. El tratamiento GG, el cual incluía en su formulación solo extracto de estevia y almidón modificado grado alimenticio como material de pared, presentó una Ef-cap del 92%, la cual es significativamente menor ($p < 0.05$) al tratamiento BB. De igual manera, el tratamiento KK que incluía solo a la goma arábiga (GA) como encapsulante de los extractos de estevia, y el tratamiento HH, el cual contenía en su formulación proteína de chícharo, GA y extracto de estevia, mostraron eficiencias de encapsulación significativamente menores al tratamiento BB, con 80.90% y 89.18% respectivamente. Sin embargo, entre estos dos tratamientos, hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), siendo el tratamiento HH más eficiente que el tratamiento KK. Estos resultados sugieren que el uso de la proteína de chícharo contribuye a la formación de interacciones entre los polifenoles de la estevia favoreciendo su encapsulación; aunado a esto, la incorporación de pectina como material encapsulante sugiere la formación de una matriz compleja mejorando la encapsulación de los polifenoles del extracto de estevia como se observa en los tratamientos AA (92.63 ± 0.77), BB (94.45%) y DD (93.00 ± 0.51). Se han reportado Ef-cap del 97.7% (Aceval et al., 2016) de polvos de polifenoles del extracto acuoso de estevia con alginato de sodio como material de pared a través de un proceso de liofilización.

8.5.2 Eficiencia de liberación (%Ef-lib)

8.5.2.1 Método de liberación de polifenoles

La liberación de los polifenoles encapsulados se realizó probando diferentes tratamientos y utilizando a los encapsulados EE (PC + GA + Proteína + ES) como modelo. Los métodos fueron los siguientes: 1) dH₂O y sonicación (85% amplitud por 5 minutos); 2) HCl 0.1 M (pH 1); 3) NaOH 0.1 M (pH 12); 4) metanol; 5) NaCl al 2%; 6) EtOH:ácido acético:agua (50:8:42 partes), y 7) agua:isooctanol:isopropanol (50:38:12 partes). La Figura 26 muestra los resultados de la Ef-lib de los polifenoles de los encapsulados EE con los diferentes métodos.

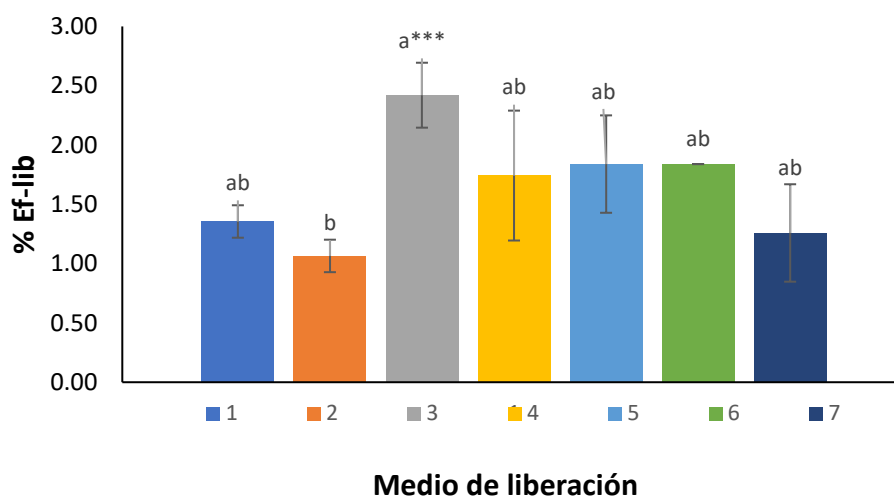


Figura 26. Resultados de la Ef-lib con diferentes métodos

Letras minúsculas distintas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p=0.05$), con la prueba de rangos múltiples de Tukey. *** Solvente elegido para la liberación de polifenoles

El análisis estadístico de los diferentes tratamientos indica que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre ellos. Los resultados muestran que el pH influyó significativamente en la liberación de los compuestos, siendo el pH alcalino (tratamiento 3: NaOH 0.1 M, pH 12) el que liberó mayor cantidad de polifenoles en comparación con el pH ácido (tratamiento 2, HCl 0.1 M, pH 1). Esto puede deberse a que a pH ácidos se incrementan las fuerzas de interacción entre polifenoles-proteína-pectinas (Thongkaew et al., 2014) causando un efecto contrario a la liberación.

Por otro lado, los tratamientos que mostraron mayor efecto para liberar los polifenoles encapsulados además del 3 (NaOH), fueron el 4 (metanol) y el 5 (NaCl). El análisis estadístico arrojó que no existe diferencia estadística significativa entre estos tres.

El efecto de la liberación de los polifenoles por la presencia del NaCl, puede ser el resultado de la capacidad de asociación de los iones sodio para aglomerar las cadenas de pectina (Groult & Budtova, 2018), promoviendo interacciones que desestabilizaron la matriz encapsulante, generando una mayor porosidad y por lo tanto, una mayor liberación. De igual manera, la matriz de encapsulación pudo haberse desestabilizado por una separación de la pectina por efecto del metanol, ya que existen estudios que demuestran que los solventes orgánicos pueden interrumpir las interacciones de la pectina en un sistema, ya que neutralizan las cargas del biopolímero, (Guo, Zhang, Meng, & Yu, 2017), lo que ocasiona que las cadenas de pectina precipiten y formar complejos entre ellas (Tho, Kjørniksen, Knudsen, & Nystro, 2006). Mientras que el resultado que se obtiene utilizando un medio básico en la liberación de los polifenoles de la matriz de encapsulación es debido probablemente al efecto del pH, ya que un pH bajo vuelve inestable a la pectina (Begum et al., 2014), e incluso puede cambiar la carga de la proteína de chícharo, modificando así la matriz de encapsulación.

Por lo anterior, el tratamiento 3 que utiliza NaOH 0.1 M junto con el ultrasonido (tratamiento 1), se utilizaron para liberar los polifenoles de los encapsulados con pectina de toronja y mandarina.

8.5.2.2 Liberación de polifenoles de la matriz polimérica

Los resultados obtenidos de la liberación de compuestos fenólicos de la matriz encapsulante que contenía las pectinas cítricas no superaron el 6% (Tabla 23), siendo el tratamiento AA el que resultó más susceptible a los tratamientos de liberación, lográndose recuperar 5.79%. Estas bajas eficiencias (Ef-lib) de liberación de los polifenoles, se pueden relacionar con una alta capacidad de la pectina en combinación con la proteína de chícharo de retener dichos compuestos; ya que existen reportes como el de Faridi et al., (2017) en donde observaron que matrices de proteína-pectina-maltodextrina retrasan la liberación de compuestos bioactivos de azafrán en comparación con una matriz ausente de pectina, esto se debe a que el complejo proteína-pectina mejora la Ef-cap teniendo una mejor protección contra la oxidación y, por lo tanto, velocidades de Ef-lib más lentas (Jiménez-Alvarado et al.. 2009).

Sin embargo, estas bajas Ef-lib posiblemente no solo se deban exclusivamente a la interacción proteína-pectina, ya que los polifenoles también pueden formar ciertos complejos durante la encapsulación. Popa et al. (2000) reportaron que la formación de complejos entre polifenoles y algunos polisacáridos puede ser reversible o irreversible, esta última probablemente ocurre en la matriz formada debido a interacciones covalentes. De igual manera se ha reportado la formación de complejos entre polifenol-proteína, ya que los polifenoles tienen cierta afinidad a sitios de unión de algunas cadenas de aminoácidos (Helal et al., 2015), este fenómeno se sustenta principalmente en interacciones hidrofóbicas entre ambas moléculas. Por lo que se puede sugerir que la interacción de proteína de chícharo-pectinas cítricas-goma arábica forma un complejo altamente estable que retrasa la liberación y por lo tanto la degradación de los compuestos fenólicos del extracto acuoso de estevia en las condiciones probadas en este trabajo. Esto se comprobó al evaluar los agentes encapsulantes por separado, en donde se observa que la goma arábica (tratamiento KK) presentó una Ef-lib del 14.94%, mientras que el tratamiento LL, que solo contenía pectina cítrica, no logró retener los compuestos fenólicos encapsulados, liberando el 93.75%. En este sentido se propone un modelo que explique la formación del complejo entre los biopolímeros en la matriz formada (Figura 27).

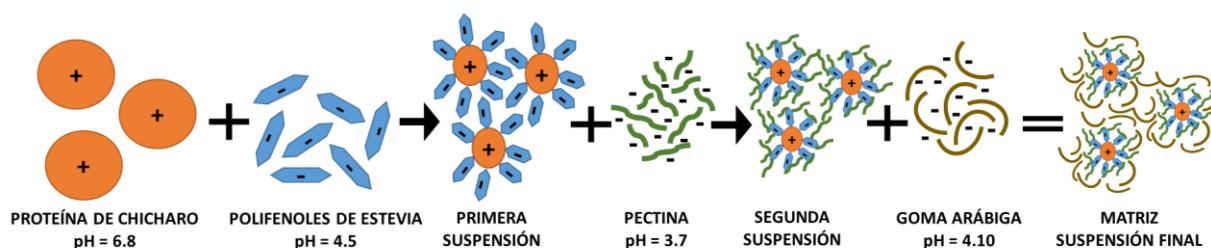


Figura 27. Formación de la matriz polimérica

8.5.3 Resistencia al calor

Se evaluó la resistencia de los encapsulados al calor, con la finalidad de conocer su posible aplicación en la elaboración de producto de panificación, tal y como lo mencionan Azzurra Papillo et al. (2018) y Vasantha et al. (2008), y de esta manera determinar si las interacciones de los polifenoles con la matriz polimérica pueden mantenerse estables para conservar la

funcionalidad de estos compuestos. Se comparó %Ef-cap antes y después ser sometidos al calor para evaluar la estabilidad que tienen a altas temperaturas.

Se observó que las altas temperaturas modificaron la Ef-cap de la matriz encapsulante provocando una disminución de entre el 5-8% con respecto a la Ef-cap inicial (Tabla 25); lo cual probablemente se debe a las reacciones de oxidación que pudieron sufrir los polisacáridos, sin embargo, pese a esto, las Ef-cap superiores al 80% demuestran que el uso de las pectinas cítricas representa una prometedora opción para la elaboración de matrices alimentarias que resistan condiciones de temperatura elevadas; por lo que posiblemente, los polvos obtenidos se puedan usar como un ingrediente para la elaboración de alimentos funcionales, sin embargo para corroborar estas suposiciones se requiere el uso de otros estudios sobre las matrices y sus interacciones.

Tabla 24. Resistencia de la matriz a altas temperaturas

| Clave | Descripción | % Ef-cap (inicial) | % Ef-cap (final) |
|-------|-------------|--------------------------|-------------------------|
| AA | PTC | 92.63±0.77 ^{ab} | 87.91±1.80 ^a |
| BB | PMC | 94.45±0.77 ^a | 86.73±1.16 ^a |
| CC | PTU | 89.54±0.25 ^c | 84.91±0.39 ^a |
| DD | PMU | 93.00±0.51 ^{ab} | 84.64±1.29 ^a |
| EE | PC | 90.00±0.12 ^{bc} | 89.27±1.41 ^a |

Letras minúsculas distintas indican diferencia estadística significativa entre filas (Tuckey, $p < 0.05$).

8.5.4 Caracterización fisicoquímica de los encapsulados

La estabilidad de los encapsulados está íntimamente relacionada con la A_w , ya que con esta propiedad coligativa es que se puede predecir la duración y la vida útil de un producto y no con su contenido de agua (humedad), y refleja el grado de interacción con los demás constituyentes, además de que se relaciona con la formulación, el control de los procesos de deshidratación y de rehidratación, la migración de la humedad en el almacenamiento y muchos otros factores (Badui-Dergal 2006). La A_w de los diferentes polvos fueron evaluados y los valores presentan diferencias mínimas significativas entre los tratamientos (Tabla 26). Se observa que los valores

están por debajo de 0.2, y coincide con el bajo contenido de agua. Estos resultados sugieren baja disponibilidad de agua libre, lo que favorece a que estos encapsulados tengan escasa susceptibilidad al crecimiento microbiano y al oscurecimiento enzimático (Badui, 2006), dándoles estabilidad y larga vida útil. Por otro lado, se observa que los valores de %humedad de los tratamientos que contenían a las pectinas cítricas (AA, BB, CC, DD, EE), fueron de ~4%; Chew et al. (2018) reportan que valores <4% es una característica de especificación para todos los polvos que se utilizan con aplicaciones alimentarias.

Tabla 25. Propiedades reconstitutivas de los polvos

| Tratamiento | Aw | Humedad (%) | Solubilidad (%) | Higroscopicidad (%) | Humectabilidad (min) |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| AA | 0.11±0.01 ^{abc} | 5.77±0.37 ^a | 9.59±0.39 ^b | 15.09±1.35 ^b | 17.74±1.14 ^a |
| BB | 0.11±0.01 ^{abc} | 4.82±0.15 ^a | 10.34±0.25 ^b | 14.64±0.24 ^a | 14.03±1.24 ^{ab} |
| CC | 0.06±0.00 ^{ef} | 4.81±0.36 ^a | 9.17±0.19 ^b | 15.42±0.40 ^b | 17.73±1.53 ^a |
| DD | 0.08±0.01 ^{de} | 4.92±0.60 ^a | 13.78±1.95 ^{ab} | 15.34±0.17 ^{ab} | 15.35±1.29 ^{ab} |
| EE | 0.10±0.00 ^{cd} | 4.30±0.62 ^{ab} | 12.19±1.41 ^{ab} | 14.60±0.92 ^b | 6.78±0.64 ^d |
| FF | 0.13±0.00 ^{ab} | 5.55±0.30 ^a | 18.78±1.58 ^a | 13.49±0.39 ^b | 11.95±2.20 ^{bc} |
| GG | 0.13±0.00 ^a | 5.35±0.74 ^a | 7.29±0.01 ^b | 10.22±0.12 ^c | 5.00±0.26 ^d |
| HH | 0.04±0.01 ^f | 5.17±0.69 ^a | 11.69±4.47 ^{ab} | 14.93±0.19 ^b | 7.24±0.51 ^{cd} |
| KK | 0.13±0.01 ^a | 5.26±0.40 ^a | 9.09±1.47 ^b | 13.83±0.98 ^b | 5.99±0.49 ^d |
| II | 0.10±0.00 ^{bcd} | 2.60±0.38 ^b | ND | 18.04±0.87 ^a | 6.50±1.20 ^d |

Letras minúsculas distintas indican diferencia estadística significativa entre filas (Tuckey, p<0.05). ND= No determinado.

La humectabilidad indica la capacidad de un polvo para absorber agua, cuanto más corto sea el tiempo para que el polvo se disuelva, mejor su atributo físico en procesos alimentarios. Se observa que los valores más elevados de este parámetro se obtuvieron en los tratamientos que contenían pectina+proteína; estos resultados pueden deberse a la posible tensión superficial que se presenta en la superficie de las microcápsulas, ya que la escasa disponibilidad de agua ocasiona que las pocas moléculas de este compuesto se comporten como una película plástica dificultando la humectación (Badui-Dergal, 2006), por lo que les toma más tiempo absorber el

agua. De hecho, este resultado se relaciona estrechamente con la solubilidad y la higroscopicidad, los cuales se reportan con porcentajes bajos.

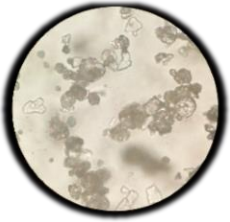
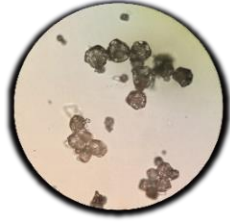
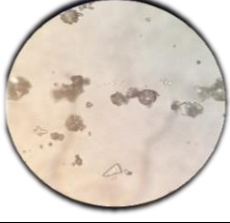
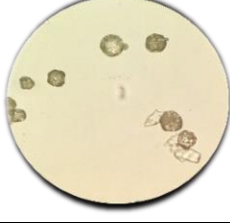
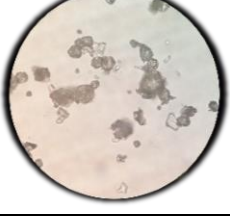
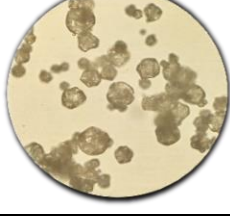
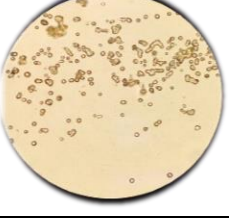
8.5.4.1 Tamaño de partícula

La estimación del tamaño de partícula se determinó a partir de la distribución que siguieron en solución (Anexo 5). Los polvos encapsulados realizados a partir de las pectinas extraídas mostraron un tamaño de partícula entre 1158 y 1373 nm, mientras que la PC (tratamiento EE) permitió una disminución del tamaño de partícula en los encapsulados, lo cual puede estar atribuido a la alta solubilidad de esta pectina en comparación con el resto. Además, se asume que el tamaño de partícula está relacionado con los compuestos fenólicos encapsulados en la mezcla de biopolímeros, puesto que el tratamiento FF (tratamiento blanco) mostro un tamaño de partícula estimado de 294 nm, el cual fue mucho menor a los polvos que contenían polifenoles.

Por otra parte, el índice de poli dispersión (IPD) es indicativo de la distribución de las moléculas en solución, Medina-Torres et al. (2017) establecen que se considera una solución con distribución amplia cuando el $IPD \geq 0.5$, mientras que cuando el $IPD \leq 0.3$ las soluciones se consideran mono-dispersas. En este sentido las partículas de los polvos tienden a ser mono-dispersas, probablemente por los complejos que se forman entre la proteína-polifenol-polisacárido; mientras que en el blanco (tratamiento FF) las partículas se encuentran ampliamente distribuidas en solución.

Las fotografías de los encapsulados se muestran a escala 2D, las partículas muestran un contorno definido en forma de esfera (Tabla 26), sin embargo, las partículas del tratamiento II (solo contiene ES) fueron de forma irregular, y su alta higroscopicidad anteriormente reportada provoco la aglomeración de estas.

Tabla 26. Fotografías ópticas de los polvos.

| | | | |
|---|--|--|--|
|  | <p>AA Tamaño de partícula estimado: 1266 nm IPD = 0.380</p> |  | <p>DD Tamaño de partícula estimado: 1158 nm IPD = 0.465</p> |
|  | <p>BB Tamaño de partícula estimado: 1182 nm IPD = 0.426</p> |  | <p>EE Tamaño de partícula estimado: 996 nm IPD = 0.330</p> |
|  | <p>CC Tamaño de partícula estimado: 1373 nm IPD = 0.559</p> |  | <p>FF Tamaño de partícula estimado: 294 nm IPD = 0.767</p> |
| |  | <p>II Tamaño de partícula estimado: ND IPD = ND</p> | |

Nota: Las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico en un objetivo de 100x.

9. Conclusiones

En cuanto a la extracción de pectina, la EAU representa una opción viable para obtener rendimientos similares a la EC pero en un menor tiempo. En el caso de la pectina de toronja, la segunda extracción es un paso primordial para recuperar la pectina absorbida en la harina residual y aumentar los rendimientos de extracción.

Asimismo, el ultrasonido genera cambios en las propiedades estructurales y funcionales de la pectina para su uso como ingrediente alimentario; no obstante, este fenómeno representa opción para la modificación de pectina, y de esta manera producir pectinas con características específicas que amplíen su área de aplicación.

En cuanto a la caracterización del EAS, se identificaron seis compuestos fenólicos: el ácido clorogénico, el ácido cafeíco, la rutina, el ácido elágico, ácido ferúlico y la diosmina. Siendo el ácido clorogénico y la diosmina los polifenoles más abundantes en el extracto acuoso.

La concentración total de polifenoles en el extracto acuoso fue de 96.71 mg/g PS, que está relacionada con su actividad antioxidante de 75% y 91.78% para los radicales DPPH y ABTS respectivamente. Las fracciones 2 y 3 que se obtuvieron en la separación de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de estevia con el método 1, presentaron la mayor actividad antioxidante, con 96.43% y 95.79% respectivamente.

Las interacciones entre la proteína de chícharo, los polifenoles del extracto acuoso de estevia y la goma arábiga permitieron la formación de una matriz polimérica estable para su encapsulación mediante secado por aspersión, en donde, la adición de pectinas cítricas a la matriz contribuyó a una mejor estabilidad de los polvos con eficiencias de encapsulación superiores a 90%, siendo la PMC la pectina que funciona mejor como agente encapsulante.

La interacción entre la proteína-polifenoles-pectina permitió que los encapsulados formados funcionaran como un agente protector efectivo de los compuestos fenólicos del extracto de estevia, debido a que resistieron condiciones drásticas de temperatura y pH. Además, los encapsulados mostraron características fisicoquímicas de interés, principalmente estabilidad térmica e higroscópica, para su posible uso en el desarrollo de alimentos funcionales.

10. Perspectivas y recomendaciones

Los resultados de las propiedades tecno-funcionales, estructurales y el comportamiento reológico de las pectinas de toronja y mandarina son de interés para demostrar en futuros ensayos su potencial como nuevos aditivos alimentarios. Además, se abre un área de estudio en cuanto al uso de la EAU para la extracción de pectina, de manera que permita eficientizar el proceso de extracción, lograr el aprovechamiento de otros residuos e incluso explorar aún más la técnica y lograr su escalamiento.

En cuanto a la bio-actividad de los extractos de estevia, se recomienda la divulgación de la información como una planta que proporciona diversos beneficios a salud, con el fin de promover su consumo e incrementar su valor comercial.

Por otra parte, los resultados obtenidos acerca del proceso de encapsulación de los compuestos fenólicos sirven de base para que en un futuro se estudie más a fondo el comportamiento e interacciones que tiene la individualidad y/o sinergia de los agentes encapsulantes, principalmente cuando se utiliza una proteína en la matriz.

Finalmente, se recomienda estudiar los mecanismos de liberación de los compuestos fenólicos encapsulados bajo condiciones similares al tracto digestivo (pruebas *in vitro* e *in vivo*), con el fin de evaluar su biodisponibilidad, actividad biológica y posible uso como ingrediente funcional.

11. Referencias bibliográficas

- Abid, M., Cheikhrouhou, S., Renard, C. M. G. C., Bureau, S., Cuvelier, G., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. *Food Chemistry*, *215*, 318–325.
- Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., & Abu-Salem, M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii* plant. *African Journal of Food Science*, *4*(5), 269–281. Retrieved from [http://www.academicjournals.org/ajfs/pdf/Pdf2010/May/Abou-Arab et al.pdf](http://www.academicjournals.org/ajfs/pdf/Pdf2010/May/Abou-Arab%20et%20al.pdf)
- Aceval Arriola, N. D., Mattos Medeiros, P., Schwinden Prudencio, E., Olivera Müller, C. M., & Dias De Mello Amboni, R. C. (2016). Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Bioscience*, *13*, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.001>
- Adetunji, L. R., Adekunle, A., Orsat, V., & Raghavan, V. (2017). Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. *Food Hydrocolloids*, *62*(168), 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.015>
- Aguiar, J., Estevinho, B. N., & Santos, L. (2016). Microencapsulation of natural antioxidants for food application e The specific case of coffee antioxidants e A review. *Trends in Food Science & Technology*, *58*, 21–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.012>
- Aguilar-Vázquez, G., Loarca-Piña, G., Figueroa-Cárdenas, J. D., & Mendoza, S. (2018). Electrospun fibers from blends of pea (*Pisum sativum*) protein and pullulan. *Food Hydrocolloids*, *83*, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.051>
- Al-dhabi, N. A., Ponmurugan, K., & Jaganatha, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics - Sonochemistry*, *34*, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>
- Alba, K., Ritzoulis, C., Georgiadis, N., & Kontogiorgos, V. (2013). Okra extracts as emulsifiers for acidic emulsions. *Food Research International*, *54*, 1730–1737. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.051>
- Aldana-Villarruel, D. S., Aguilar-González, C. N., Contreras-Esquivel, J. C., & Nevárez-Moorillon, G. V. (2011). Moléculas pécticas: extracción y su potencial aplicación como empaque. *Tecnociencia*, *5*(2), 76–82.
- Aliakbarian, B., Coelho, F., Teles, J., Faria, D., Grijó, C., Lovaglio, F., ... Perego, P. (2018). Optimization of spray drying microencapsulation of olive pomace polyphenols using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network. *LWT - Food Science and Technology*, *93*(March), 220–228.
- Ameer, K., Chun, B.-S., & Kwon, J.-H. (2017). Optimization of supercritical fluid extraction of steviol glycosides and total phenolic content from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves using response surface methodology and artificial neural network modeling. *Industrial Crops and Products*, *109*, 672–685. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.09.023>

- Amirante, R., Distaso, E., Tamburrano, P., Paduano, A., Pettinicchio, D., & Clodoveo, M. L. (2017). Acoustic cavitation by means ultrasounds in the extra virgin olive extraction process. *Energy Procedia: 72nd Conference of the Italian Thermal Machines Engineering Association*, 126, 82–90.
- Andrés González-Moralejo, S. (2011). Aproximación a La Comprensión De Un Endulzante Natural Alternativo, La Stevia Rebaudiana Bertoni: Producción, Consumo Y Demanda Potencial. *Agroalimentaria.*, 17(32), 57–69. Retrieved from http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/33312/1/art4_andresg-m_r32.pdf
- Angarita Alonso, R. C., & González Medina, C. M. (2005). *Manual para la elaboración artesanal de productos cárnicos utilizando carne de cuy (Cavia Porcellus)*. Universidad de la Salle, Colombia.
- Anton, S. D., Martin, C. K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W. T., Geiselman, P., & Williamson, D. A. (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.APPET.2010.03.009>
- Arroyo Salas, Y., Carrasco Colque, M., Bueno Lazo, C., Cardeña Corymanya, R., & Luízar Obregón, C. (2008). Obtención y caracterización fisicoquímica y funcional del níspero común (*Mespilus germanica*). *Revista Sociedad Química de Perú*, 74(4), 269–281.
- Azzi, J., Jraij, A., Auezova, L., & Fourmentin, S. (2018). Food Hydrocolloids Novel findings for quercetin encapsulation and preservation with cyclodextrins , liposomes , and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes, 81, 328–340.
- Azzurra Papillo, V., Locatelli, M., Travaglia, F., Bordiga, M., Garino, C., Arlorio, M., & Coisson, J. D. (2018). Spray-dried polyphenolic extract from Italian black rice (*Oryza sativa* L., var. Artemide) as new ingredient for bakery products. *Food Chemistry*, 269(March), 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.059>
- Baas Dzul, L. V., Pacheco López, N. A., Rodríguez Buenfil, I. M., & Ramírez Sucre, M. O. (2015). *Tesis: Obtención de extractos polifenólicos con actividad biológica a partir de harinas elaboradas con subproductos de limón italiano*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
- Badillo Perero, M. D., & Pilamunga, C. (2011). *Estudio comparativo del potencial nutritivo del limón persa (Citrus latifolia tanaka) deshidratado en secador de bandejas y microondas*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Pearson Ed). México.
- Bagherian, H., Zokae Ashtiani, F., Fouladitajar, A., & Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional , microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 50(11–12), 1237–1243. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.08.002>
- Baltazar Flores, R., Carbajal Mariños, D., Baca Rodríguez, N., & Salvador Rodríguez, D. (2013). Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta.

Agroindustrial Science, 2, 77–89.

- Barba, F. J., Esteve, J., & Fri, A. (2014). Bioactive Components from Leaf Vegetable Products, 41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63294-4.00011-5>
- Barba, F. J., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015). Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Journal of Food Engineering*, 149, 222–228. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.10.028>
- Barboza, M. (2013). Aprovechamiento de la corteza de los cítricos. Retrieved from <http://www.tecnicoagricola.es/2013/03/page/2/>
- Bartolomeu, B. G., Pinheiro, A. C., Carneiro-Da-Cunha, M. G., & Vicente, A. A. (2012). Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan - Evaluation of its gas barrier properties and application on “Tommy Atkins” mangoes. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.021>
- Bayar, N., Bouallegue, T., Achour, M., Kriaa, M., Bougatef, A., & Kammoun, R. (2017). Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal : Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties . *Food Chemistry*, 235, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.029>
- Bayar, N., Friji, M., & Kammoun, R. (2018). Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal. *Food Chemistry*, 241(April 2017), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.051>
- Bayar, N., Kriaa, M., & Kammoun, R. (2016). Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.042>
- Begum, R., Aziz, M. G., Uddin, M. B., & Yusof, Y. A. (2014). Characterization of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) waste pectin as influenced by various extraction conditions. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.035>
- Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rodríguez-Juan, E., González-Benjumea, A., & Fernández-Bolaños, J. (2018). Molecular interactions between 3 , 4-dihydroxyphenylglycol and pectin and antioxidant capacity of this complex in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 197(December 2017), 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.089>
- Binsi, P. K., Nayak, N., Sarkar, P. C., Jeyakumari, A., Ashraf, P. M., Ninan, G., & Ravishankar, C. N. (2017). Structural and oxidative stabilization of spray dried fish oil microencapsulates with gum arabic and sage polyphenols : Characterization and release kinetics, 219, 158–168.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489. <https://doi.org/10.1016/0003->

- Boчек, A. M., Zabivalova, N. M., & Petropavlovskii, G. A. (2001). Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Macromolecular Chemistry and Polymeric Materials*, 74(5), 796–799.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brandle, J. E., Starratt, a N., & Gijzen, M. (1998). Stevia rebaudiana : Its agricultural , biological , and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78(4), 527–536. <https://doi.org/10.4141/P97-114>
- Brunner, G. (2009). Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.09.002>
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Bursać Kovačević, D., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., ... Putnik, P. (2018). Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from Stevia rebaudiana Bertoni leaves: A review. *Food Chemistry*, 268, 513–521. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.091>
- Cabarcas Henao, E., Guerra Benedetti, A. F., Henao Balseiro, C. A., & Acevedo Morantes, M. T. (2012). *Extracción y caracterización de pectina a partir de cáscaras de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción*. Universidad de Cartagena, Colombia.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Calvo Rebollar, M. (2018). TEMA 7: POLISACARIDOS NO DIGESTIBLES DE LOS ALIMENTOS: CELULOSA Y PECTINAS. Retrieved from <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/pectinas.html>
- Carrasco Venegas, L., Castañeda Pérez, L., & Altamirano Oncoy, K. (2015). Determinación de los parámetros reológicos de un champú con el modelo de Carreau-Yasuda. *Campus*, (20), 21–38. Retrieved from oai:www.repositorioacademico.usmp.edu.pe:usmp/2160
- Carrera, C., Ruiz-rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- Celaya, L., Cabana, R., Viturro, C., & Kolb, N. (2012). Infusión de Stevia rebaudiana Bertoni: sólidos totales, esteviolglicósidos endulzantes y actividad antioxidante. *IV Congreso Internacional de Ciencia Y Tecnología de Los Alimentos, Córdoba, Argentina, 14 a 16 de Noviembre de 2012, Noviembre*, 92–97.

- Ceunen, S., & Geuns, J. M. C. (2013). Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry*, *89*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.01.007>
- Chang-won, C., Do-youn, L., & Chan-wha, K. (2003). Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system. *Carbohydrate Polymers*, *54*, 21–26. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00133-4)
- Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2018). Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *International Journal of Pharmaceutics*, *553*(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.032>
- Chen, H., Fu, X., & Luo, Z. (2015). Properties and extraction of pectin-enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic-assisted treatment combined with subcritical water. *Food Chemistry*, *168*, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.078>
- Chen, H., Fu, X., & Luo, Z. (2016). Effect of molecular structure on emulsifying properties of sugar beet pulp pectin. *Food Hydrocolloids*, *54*, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.021>
- Chen, M., Zhao, Y., & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, *172*, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.110>
- Chevalier, L. M., Rioux, L., Angers, P., & Turgeon, S. L. (2019). Study of the interactions between pectin in a blueberry puree and whey proteins: Functionality and application. *Food Hydrocolloids*, *87*(February 2018), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.038>
- Chew, S. C., Tan, C. P., & Nyam, K. L. (2018). Microencapsulation of refined kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil by spray drying using β -cyclodextrin/gum arabic/sodium caseinate. *Journal of Food Engineering*, *237*(February), 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.016>
- Chomto, P., & Nunthanid, J. (2017). Physicochemical and powder characteristics of various citrus pectins and their application for oral pharmaceutical tablets. *Carbohydrate Polymers*, *174*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.049>
- Ciulu, M., Quirantes-Piné, R., Spano, N., Sanna, G., Borrás-Linares, I., & Segura-Carretero, A. (2017). Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Industrial Crops and Products*, *108*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.06.024>
- Colodel, C., Vriesmann, L. C., & De Oliveira Petkowicz, C. L. (2018). Cell wall polysaccharides from Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) peel. *Carbohydrate Polymers*, *195*(December 2017), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.066>
- Covarrubias-Cárdenas, A. G., Martínez-Castillo, J. I., Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., García-Cruz, N. U., & Pacheco, N. (2018). Antioxidant Capacity and UPLC-PDA ESI-MS Phenolic Profile of *Stevia rebaudiana* Dry Powder Extracts Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. *Agronomy*, *8*(170), 2–13. <https://doi.org/10.3390/agronomy8090170>

- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, *103*, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.024>
- D'Addosio, R., Páez, G., Marín, M., Mármol, Z., & Ferrer, J. (2005). Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) . *Revista de La Facultad de Agronomía* . scielo_ven .
- da Silva, I. S. V., de Sousa, R. M. F., de Oliveira, A., de Oliveira, W. J., Motta, L. A. C., Pasquini, D., & Otaguro, H. (2018). Polymeric blends of hydrocolloid from chia seeds/apple pectin with potential antioxidant for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.061>
- Devia Pineda, J. E. (2003). *Proceso para producir Pectinas Cítricas*. *Revista Universidad Eafit* (Vol. 39).
- Di Giorgio, L., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2019). Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. *Food Hydrocolloids*, *87*(September 2018), 891–901. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.024>
- Dominiak, M., Søndergaard, K. M., Wichmann, J., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G. T., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2014). Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. *Food Hydrocolloids*, *40*, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.009>
- Dos Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P., & Petto de Souza, G. E. (2006). Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *29*(11), 2236–2240. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2236>
- Dranca, F., & Oroian, M. (2018). Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Research International*, *113*(February), 327–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Duran, S., Rodríguez N., M. del P., Córdón A., K., & Record C., J. (2012). Stevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Revista Chilena de Nutrición*, *39*(4), 203–206. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000400015>
- Fanaro, S., Jelinek, J., Stahl, B., Boehm, G., Kock, R., & Vigi, V. (2005). Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *41*, 186–190.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, *129*(3), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.093>

- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M., & Lafay, S. (2008). Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *The Journal of Nutrition*, (1), 2309–2315. <https://doi.org/10.3945/jn.108.095554>.Federal
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.11.149>
- Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Piergiovanni, L., & Yam, K. L. (2009). Development of hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.04.003>
- Fishman, M. L., Chau, H. K., Qi, P. X., Hotchkiss, A. T., & Yadav, M. P. (2013). Physico-chemical characterization of protein-associated polysaccharides extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 2257–2266. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.001>
- Foegeding, E. A., Plundrich, N., Schneider, M., Campbell, C., & Lila, M. A. (2018). Reprint of “Protein-polyphenol particles for delivering structural and health functionality.” *Food Hydrocolloids*, 78, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.047>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–648.
- Fraeye, I., Duvetter, T., Doungra, E., Loey, A. Van, & Hendrickx, M. (2010). Fine-tuning the properties of pectin e calcium gels by control of pectin fine structure , gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.001>
- Freitas de Oliveira, C., Giordani, D., Lutckemier, R., Deyse Gurak, P., Cladera-Olivera, F., & Ferreira Marczak, L. D. (2016). Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.027>
- Fu, S., Wu, C., Wu, T., Yu, H., Yang, S., & Hu, Y. (2017). Preparation and characterisation of Chlorogenic acid-gelatin: A type of biologically active film for coating preservation. *Food Chemistry*, 221, 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.123>
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., & Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.047>
- Gamboa Bandry, M. (2009). *Aprovechamiento de los residuos obtenidos del proceso de despulpado del mango (Mangifera indica l.), de las variedades smith, tommy atkins, haden y bocado como materias primas para la obtención de pectinas. Universidad de Oriente.*
- Gamboa Bandry, M., & Duerto, S. (2009). *Aprovechamiento de los residuos obtenidos del proceso de despulpado del mango (Mangifera indica L.), de las variedades Smith, Tommy Atkins, Haden y Bocado como materias primas para la obtención de pectinas. Universidad de Oriente Venezuela.*

- Gan, C. Y., Abdul Manaf, N. H., & Latiff, A. A. (2010). Physico-chemical properties of alcohol precipitate pectin-like polysaccharides from *Parkia speciosa* pod. *Food Hydrocolloids*, 24(5), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.014>
- Ganesh Moorthy, I., Prakash Maran, J., Muneeswari Surya, S., Naganyashree, S., & Shivamathi, C. S. (2015). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1323–1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.037>
- Gasmalla, M. A. A., Yang, R., & Hua, X. (2014). Stevia rebaudiana Bertoni: An alternative Sugar Replacer and Its Application in Food Industry. *Food Engineering Reviews*, 6(4), 150–162. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9080-0>
- Gasmalla, M. A., Yang, R., Musa, A., Hua, X., & Zhang, W. (2014). Physico-chemical Assessment and Rebaudioside A Productivity of Natural Sweeteners (Stevia Rebaudiana Bertoni). *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(5), 209–214. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-5-1>
- Ghasemi, S., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Khomeiri, M. (2017). Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. *Carbohydrate Polymers*, 177, 369–377. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.09.009>
- Ghasemi, S., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Khomeiri, M. (2018). Nanoencapsulation of D - limonene within nanocarriers produced by pectin-whey protein complexes. *Food Hydrocolloids*, 77, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.030>
- Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H., & Alonso, J. L. (2016). Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. *Journal of Functional Foods*, 20, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.029>
- Gómez García, R., Martínez Ávila, G. C., Rodríguez Herrera, R., & Aguilar-González, C. N. (2012). Fuentes y beneficios de los antioxidantes fenólicos. *Revista de Divulgación Científica Ciencia Abierta*, (31). Retrieved from <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC31/5.html>
- Góngora Salazar, V. A., Vázquez Encalada, S., Corona Cruz, A., & Segura Campos, M. R. (2018). Stevia rebaudiana: A sweetener and potential bioactive ingredient in the development of functional cookies. *Journal of Functional Foods*, 44, 183–190. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.03.007>
- González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 2176–2184.
- González, G. (2005). Aplicaciones del calentamiento por inducción electromagnética en el procesamiento de PRFV. *Editorial Emma Fiorentino Publicaciones Tecnicas S.R.L.*, 1–8.
- Goyal, S. K., Samsheer, & Goyal, R. K. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 1–10.

<https://doi.org/10.3109/09637480903193049>

- Granados, C., Guzman, L. E., Acevedo, D., Díaz, M., & Herrera, A. (2014). PROPIEDADES FUNCIONALES DEL ALMIDON DE SAGU (*Maranta arundinacea*). *Biotechnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 12(2), 90–96.
- Grassino, A. N., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., & Rimac Brnčić, S. (2016). Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, 198, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.095>
- Groult, S., & Budtova, T. (2018). Tuning structure and properties of pectin aerogels. *European Polymer Journal*, 108(July), 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.08.048>
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., & Antunes, M. D. C. (2015). Raspberry fresh fruit quality as affected by pectin- and alginate-based edible coatings enriched with essential oils. *Scientia Horticulturae*, 194, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.004>
- Guo, X., Guo, X., Meng, H., Zhang, B., & Yu, S. (2017). Using the high temperature resistant pH electrode to auxiliarily study the sugar beet pectin extraction under different extraction conditions. *Food Hydrocolloids*, 70, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.032>
- Guo, X., Zhang, T., Meng, H., & Yu, S. (2017). Ethanol precipitation of sugar beet pectins as affected by electrostatic interactions between counter ions and pectin chains. *Food Hydrocolloids*, 65, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.010>
- Gutiérrez La Torre, E., & Pascual, G. (2016). Caracterización de cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*) en polvo e inclusión en una formulación panaria. *Agronomía Colombiana Suplemento*, 1(October), S5–S8. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.sup.2016n1.57938>
- Harbourne, N., Jacquier, J. C., & O’Riordan, D. (2009). Optimisation of the extraction and processing conditions of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) for incorporation into a beverage. *Food Chemistry*, 115(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.044>
- Helal, A., Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2015). Gastro-pancreatic release of phenolic compounds incorporated in apolyphenols-enriched cheese-curd. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 957–963. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.037>
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., & Yarmand, M. S. (2016). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140, 59–65.
- Hotchkiss, A. T., Olano-Martin, E., Grace, W. E., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Pectic Oligosaccharides as Prebiotics, (April 2003), 54–62. <https://doi.org/10.1021/bk-2003-0849.ch005>
- Hubert Geerkens, C., Nagel, A., Meike Just, K., Miller-Rostek, P., Rolf Kammerer, D., Martin Schweiggert, R., & Carle, R. (2015). Mango pectin quality as influenced by cultivar, ripeness, peel particle size, blanching, drying, and irradiation. *Food Hydrocolloids*, 51,

- Hwang, S. H., Kwon, S. H., Kim, S. B., & Lim, S. S. (2017). Inhibitory activities of *Stemodia hexaphylla* leaf constituents on rat lens aldose reductase and formation of advanced glycation end products and antioxidant. *BioMed Research International*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/4273257>
- Islas, R. P. (2002). Alimentos Microencapsulados : Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. *Memorias Del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 438–447. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.6.7047>
- Jacobek, L., Matić P. (2018). Non-covalent dietary fiber-polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.024>.
- Jamsazzadeh Kermani, Z., Shpigelman, A., Kyomugasho, C., Van Buggenhout, S., Ramezani, M., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2014). The impact of extraction with a chelating agent under acidic conditions on the cell wall polymers of mango peel. *Food Chemistry*, 161, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.131>
- Jentzer, J.-B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., & Vilarem, G. (2015). Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*, 166, 561–567. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.06.078>
- Jeria Heitmann, D. M., Pozo Cofré, A. A., Castro M., E., & Puente D., L. (2011). *Estudio del secado convectivo de hojas de stevia rebaudiana y factibilidad técnico-económica de una planta elaboradora de edulcorante a base de stevia*. Universidad de Chile.
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2425–2433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.022>
- Kamozawa, A., & Talbot, H. A. (2008, July). Pectin: Not just for jelly. *Revista de Divulgación Pópular Science*. Retrieved from <http://www.popsoci.com/diy/article/2008-07/pectin-not-just-jelly>
- Kaushik, R., Pradeep, N., Vamshi, V., Muthukumaran, G., & Usha, A. (2010). Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 47(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0011-7>
- Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H., & Kang, S. N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1328–1332. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.003>
- Kosegarten-Conde, M. T., & Jiménez-munguía, C. E. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 1–18.

- Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brnčić, M., Grimi, N., ... Barba, F. J. (2015). Current and New Insights in the Sustainable and Green Recovery of Nutritionally Valuable Compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6835–6846. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01994>
- Koubala, B. B., Kansci, G., Mbome, L. I., Crepeau, M. J., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. *Food Hydrocolloids*, 22, 1345–1351. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.07.005>
- Kroyer, G. T. (1999). The Low Calorie Sweetener Stevioside: Stability and Interaction with Food Ingredients. *LWT - Food Science and Technology*, 32(8), 509–512. <https://doi.org/10.1006/food.1999.0585>
- Kujundžić, D., Jambrak, A. R., Vukušić, T., Stulić, V., Kljusurić, J. G., Banović, M., & Herceg, Z. (2017). Near-infrared spectroscopic characterization of steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-power ultrasound and gas-phase plasma. *Journal of Food & Nutrition Research*, 56(2), 109–120. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=a9h&AN=123354985&site=ehost-live>
- Kumbar, V., Nedomová, S., Pytel, R., Kilián, L., & Bichar, J. (2017). Study of rheology and friction factor of natural food hydrocolloid gels. *Slovak Journal of Food Sciences*, 11(1), 203–209. <https://doi.org/10.5219/735>
- Kurozawa, L. E., & Hubinger, M. D. (2017). Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science*, 15, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.004>
- Labuschagne, P. (2018). Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. *Food Research International*, 107(January 2018), 227–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.026>
- Lado, J., Pintos, P., Luque, E., & Moltini, A. I. (2016). *Aplicación de bajas temperaturas en la poscosecha de los frutos cítricos: Estrategias para minimizar el daño por frío. Jornadas de divulgación del programa de investigación en producción citrícola No 770*. Salto Grande, Uruguay. Retrieved from http://www.inia.uy/Documentos/Públicos/INIA_Salto_Grande/2016/2016_12_16_PoscosechaFrutosCitrlicos/SAD_770.pdf
- Lefsih, K., Delattre, C., Pierre, G., Michaud, P., Aminabhavi, T. M., Dahmoune, F., & Madani, K. (2016). Extraction, characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of *Opuntia ficus indica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 645–652.
- Lefsih, K., Giacomazza, D., Dahmoune, F., Mangione, M. R., Bulone, D., San Biagio, P. L., ... Madani, K. (2017). Pectin from *Opuntia ficus indica*: Optimization of microwave-assisted extraction and preliminary characterization. *Food Chemistry*, 221, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.073>
- Lemus-Mondaca, R., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, A., Honores, C., & Moraga, N. O. (2016).

- Stevia rebaudiana* Leaves: Effect of Drying Process Temperature on Bioactive Components, Antioxidant Capacity and Natural Sweeteners. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0524-3>
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17, 455–462. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00027-4)
- Liang, R., Chen, J., Liu, W., Liu, C., Yu, W., Yuan, M., & Zhou, X. (2012). Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*Ficus pumila* Linn.) seeds. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.013>
- Liew, S. Q., Ngoh, G. C., Yusoff, R., & Teoh, W. H. (2016). Sequential ultrasound-microwave assisted acid extraction (UMAE) of pectin from pomelo peels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.065>
- Liew, S. Q., Ngoh, G. C., Yusoff, R., & Teoh, W. H. (2018). Acid and Deep Eutectic Solvent (DES) extraction of pectin from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13(November 2017), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.001>
- Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., & Yao, J. (2010). Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource Technology*, 101(9), 3268–3273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.062>
- Liu, Y., Dong, M., Yang, Z., & Pan, S. (2016). Anti-diabetic effect of citrus pectin in diabetic rats and potential mechanism via PI3K/Akt signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 484–488. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.015>
- Lobato García, C. E., Gómez Rivera, A., Alor Chávez, M. de J., Hernández Vargas, C., & Díaz Oliva, V. del C. (2008). Cuantificación de flavonoides, taninos y esteroides en plantas medicinales de uso tradicional en Tabasco. *Semana de Divulgación Y Video Científico 2008*, 76–80.
- López-Córdoba, A., Gallo, L., Bucalá, V., Martino, M., & Navarro, A. (2015). Co-crystallization of zinc sulfate with sucrose: A promissory strategy to render zinc solid dosage forms more palatable. *Journal of Food Engineering*, 170, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.024>
- López-Díaz, M. T., Medán-Robledo, E., Gilabert Santos, J. A., & Encinas Cerezo, T. (2014). De la stevia al E-960: un dulce camino. *Reduca: Recursos Educativos. Serie Congresos Alumnos*, 6(1), 305–311. Retrieved from <http://www.revistareduca.es/index.php/reduca/article/view/1699/1718>
- López, V., Pérez, S., Vinuesa, A., Zorzetto, C., & Abian, O. (2016). *Stevia rebaudiana* ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside. *Food and Function*, 7(4), 2107–2113. <https://doi.org/10.1039/c5fo01586c>
- López Domínguez, C. M., Sánchez Contreras, M. de los Á., Rodríguez Buenfil, I. M., & Pacheco

- López, N. A. (2014). *Evaluación de la sacarificación de residuos cítricos empleando microorganismos productores de celulosomas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
- López Hernández, O. D. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(3), 381–389.
- López Martínez, N. J., Sañudo Barajas, J. A., Aguilar, C. N., Rodríguez Herrera, R., & Contreras Esquivel, J. C. (2011). Pectina de mango: perspectivas para su extracción. *Revista de Divulgación Científica Humanística Y de Tecnología Ciencia-Cierta*, (27). Retrieved from <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC27/7.html>
- Lozano Berna, M. (2009). *Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de Opuntia stricta mediante secado por atomoización*. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1595–1639. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.005>
- Luque-García, J. L., & Luque de Castro, M. D. (2003). Ultrasound: A powerful tool for leaching. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X)
- Ma, S., Yu, S., Zheng, X., Wang, X., Bao, Q., & Guo, X. (2013). Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 750–753. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.042>
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(October 2015), 727–747. <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Martínez Castillo, J. I., Reyes-Munguía, A., & Vázquez Elorza, A. (2014). *MICROENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE MAGUEY MORADO (Rhoeo discolor) UTILIZANDO MUCÍLAGO DE NOPAL (Opuntia ficus-indica) COMO ENCAPSULANTE*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Mayan Sweet, E. (n.d.). Mayan Sweet, Stevia en Polvo Verde, 40 g. Retrieved from <https://www.organicosenlinea.com/products/mayan-sweet-stevia-en-polvo-verde-40-g?variant=33200824837>
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(47), 1–19. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Mierczynska, J., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2017). Rheological and chemical properties of pectin enriched fractions from different sources extracted with citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 156, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.042>

- Migliori, M., Gabriele, D., Checchetti, A., & Battipede, B. (2010). Compatibility analysis of pectin at different esterification degree from intrinsic viscosity data of diluted ternary solutions. *Reactive and Functional Polymers*, 70(10), 863–867. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.07.011>
- Montoya-López, J., Giraldo-Giraldo, G. A., & Lucas-Aguirre, J. C. (2012). Determinación del índice de blancura en harina de trigo comercial. *Vitae*, 19(1), S415–S416. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914130.pdf>
- Morales-Contreras, B. E., Rosas-Flores, W., Contreras-Esquivel, J. C., Wicker, L., & Morales-Castro, J. (2018). Pectin from Husk Tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.): Rheological behavior at different extraction conditions. *Carbohydrate Polymers*, 179(2017), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.097>
- Morales Martínez, Y., López Cuellar, M. del R., Chavarría-Hernández, N., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2017). Pectinas de fuentes no convencionales: tuna (*Opuntia albicarpa*) y xoconostle (*Opuntia matudae*). *XVII Congreso Nacional de Biotecnología Y Bioingeniería*, 29.
- Morlock, G. E., Meyer, S., Zimmermann, B. F., & Roussel, J.-M. (2014). High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 102–111.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1865–1872. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.002>
- Munarin, F., Tanzi, M. C., & Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002>
- Mungure, T. E., Roohinejad, S., Bekhit, A. E. D., Greiner, R., & Mallikarjunan, K. (2018). Potential application of pectin for the stabilization of nanoemulsions. *Current Opinion in Food Science*, 19, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.011>
- Muñoz-Almagro, N., Montilla, A., Moreno, F. J., & Villamiel, M. (2017). Modification of citrus and apple pectin by power ultrasound: Effects of acid and enzymatic treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 807–819. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.039>
- Naghshineh, M., Olsen, K., & Georgiou, C. A. (2013). Sustainable production of pectin from lime peel by high hydrostatic pressure treatment. *Food Chemistry*, 136(2), 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.036>
- Naqash, F., Masoodi, F. A., Ahmad Rather, S., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin - a review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.058>
- Neria De la Cruz, R., Cruz Casino, N., Sandoval Gallegos, E. M., Sumaya Martínez, T., & Cariño Cortes, R. (2015). Optimización de la extracción por termoultrasonido de

- compuestos antioxidantes a partir de residuos de mango (*Mangifera indica* L.), utilizando la metodología de superficie de respuestae. *Boletín Científico de Ciencias de La Salud*, 4(7). Retrieved from <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icsa/n7/p4.html>
- Noello, C., Carvalho, A. G. S., Silva, V. M., & Hubinger, M. D. (2016). Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition. *Food Research International*, 89, 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.003>
- NOM-247-SSA1-2008. NOM-247-SSA1-2008. Norma Oficial Mexicana, productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, semolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, semolas o semolinas o sus mezclas. Productos d (2009). México: Diario Oficial de la Federación.
- Noreen, A., Nazli, Z. i. H., Akram, J., Rasul, I., Mansha, A., Yaqoob, N., ... Zia, K. M. (2017). Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 254–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.029>
- NOVASINA. (n.d.). *La importancia de la aw (actividad de agua)*. Retrieved from [http://www.equinlab.com/pdf_/La importancia de la actividad de agua \(aw\).pdf](http://www.equinlab.com/pdf_/La%20importancia%20de%20la%20actividad%20de%20agua%20(aw).pdf)
- Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): A comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(2), 165–170. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0141>
- Olguín Contreras, G., Meléndez Mier, G., Zúñiga R., A., & Pasquetti Ceccatelli, A. (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología Y Nutrición*, 12(4), 199–206.
- Onyango Ogutu, F., & Mu, T. (2017). Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 726–734.
- Pace, G., Lima, P., Vianello, F., Corrêa, C. R., Arnoux, R., Campos, D. S., & Borguini, M. G. (2014). Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and Nutrition Sciences*, 5(5), 1065–1082. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.511117>
- Pacifico, S., Piccolella, S., Nocera, P., Tranquillo, E., Dal Poggetto, F., & Catauro, M. (2019). New insights into phenol and polyphenol composition of Stevia rebaudiana leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 163, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.046>
- Pagliari, M., National, I., Ciriminna, R., National, I., Marina, A., Fidalgo, A., ... Delisi, R. (2016). Pectin Production and Global Market. *Agro Food Industry Hi Tech*, 27(5), 17–20.
- Paharia, A., Yadav, A. K., Rai, G., Jain, S. K., Pancholi, S. S., & Agrawal, G. P. (2007). Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting. *AAPS PharmSciTech*, 8(1), E87–E93. <https://doi.org/10.1208/pt0801012>
- Pan-utai, W., & Iamtham, S. (2018). Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.026>

- Panouillé, M., Thibault, J. F., & Bonnin, E. (2006). Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8926–8935. <https://doi.org/10.1021/jf0617824>
- Parras Huertas, R. A. (2011). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 37055. <https://doi.org/0304-2847>
- Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Revisión Microencapsulación con alginato en alimentos . Técnicas y aplicaciones Microencapsulation in alginate for food . Technologies and applications, 3(1), 130–151.
- Pasquel, A. (2001). GOMAS : UNA APROXIMACIÓN A LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS, 8, 1–8.
- Pereira Souza, A. C., Deyse Gurak, P., & Ferreira Marczak, L. D. (2017). Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.012>
- Periche, A., Martínez-Las Heras, R., Heredia, A., Espert, M., Escriche, I., Castelló, M. L., & Andrés, A. (2012, November). Cinética de extracción de compuestos antioxidantes en infusiones de hoja de estevia. *CESIA-VII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, UCLM-Univ.* <https://doi.org/10.1080/01402390.2011.569130>
- Petkowicz, C. L. O., Vriesmann, L. C., & Williams, P. A. (2017). Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. *Food Hydrocolloids*, 65, 57–67. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16306877>
- Petti, S., & Scully, C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37(6), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.003>
- Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2018). Effect of thermal treatment, microwave, and pulsed electric field processing on the antimicrobial potential of açai (*Euterpe oleracea*), stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), and ginseng (*Panax quinquefolius* L.) extracts. *Food Control*, 90, 98–104. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.02.022>
- Ponmurugan, K., Al-dhabi, N. A., Prakash Maran, J., Karthikeyan, K., Ganesh Moothy, I., Sivarajasekar, N., & Jony Blessing, J. (2017). Ultrasound assisted pectic polysaccharide extraction and its characterization from waste heads of *Helianthus annuus*. *Carbohydrate Polymers*, 173, 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.018>
- Popa, M. I., Aelenei, N., Popa, V. I., & Andrei, D. (2000). Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 45(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00009-2](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00009-2)
- Posé, S., Kirby, A. R., Mercado, J. A., Morris, V. J., & Quesada, M. A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.029>
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., & Randeria, N. P. (2013). Pharmaceutical

- applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1685–1699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.021>
- Prakash Maran, J., & Priya, B. (2015). Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 115, 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.058>
- Prakash Maran, J., Priya, B., Al-dhabi, N. A., Ponmurugan, K., Ganesh Moorthy, I., & Sivarajasekar, N. (2017). Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of *Musa balbisiana*. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 35, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.019>
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.052>
- Preece, K. E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P. J., & Zuidam, N. J. (2017). Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 113, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.09.003>
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 25(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rainey, A., & Caballero, M. J. (2017). Frutas con beta-caroteno. Retrieved from https://muyfitness.com/frutas-betacaroteno-info_17422/
- Raji, Z., Khodaiyan, F., Rezaei, K., & Kiani, H. (2017). Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.146>
- Ramírez, M. J., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2015). Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates, 277, 89–96.
- Ramos Chan, C. A., & López Pacheco, N. A. (2015). *Extracción y caracterización de pectina obtenida a partir de harina de subproductos de limón persa (Citrus latifolia Tanaka) derivada de un proceso secuencial*. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Ramos Llica, E., Castañeda Castañeda, B., & Ibáñez Vásquez, L. A. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Peru Salud*, 15(1), 42–46.
- Ravnik, J., Golobič, I., Sitar, A., Avanzo, M., Irman, Kočevar, K., ... Hriberšek, M. (2018). Lyophilization model of mannitol water solution in a laboratory scale lyophilizer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 45(November 2017), 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.02.015>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free*

Radical Biology & Medicine, 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.
- Rincón, A. M., Vásquez, A. M., & Padilla, F. C. (2005). Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(3), 305–310 .
- Rivera, L. L., & Vilarem, G. (2007). Hydrodistillation of caraway by direct induction heating assisted by a magnetic field process. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(3), 178–183. <https://doi.org/10.1002/ffj.1777>
- Sabater, C., Corzo, N., Olano, A., & Montilla, A. (2018). Enzymatic extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products using Celluclast 1.5L. *Carbohydrate Polymers*, 190(February), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.055>
- Salvador-Reyes, R., Sotelo-Herrera, M., & Paucar-Menacho, L. (2014). Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, 5(3), 157–163. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.03.06>
- Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2010). New technologies for functional food manufacture product development. *Functional Food Prodcut Development*, (ISBN 978-1-405-17876-1).
- Sardar, B. R., & Singhal, R. S. (2013). Characterization of co-crystallized sucrose entrapped with cardamom oleoresin. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.011>
- Seixas, F. L., Fukuda, D. L., Turbiani, F. R. B., Garcia, P. S., Petkowicz, C. L. D. O., Jagadevan, S., & Gimenes, M. L. (2014). Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids*, 38, 186–192.
- Shabani, S., & Ali Mirshekar, M. (2018). Diosmin is neuroprotective in a rat model of scopolamine-induced cognitive impairment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108(September), 1376–1383. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.127>
- Shah, J. J., & Mohanraj, K. (2014). Comparison of Conventional and Microwave-assisted Synthesis of Benzotriazole Derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(1), 46–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4007255/>
- Shaha, R. K., Punichelvana, Y. N. A. P., & Afandi, A. (2013). Optimized Extraction Condition and Characterization of Pectin from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*). *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, 1(2), 1–11.
- Sharma, B. R., Naresh, L., Dhuldhoya, N. C., Merchant, S. U., & Merchant, U. C. (2006). An Overview on Pectins. *Times Food Processing Journal*, 51(June-July), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.10.005>
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., & Bajpai, V. K. (2012). Antioxidant ability and total phenolic

- content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7–8), 807–811. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.02.002>
- Šić Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Ježek, D., Bosiljkov, T., & Brnčić, M. (2013). *Stevia rebaudiana* Bertoni- A review of nutritional and biochemical properties of natural sweetener. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(1), 25–30. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875656068&partnerID=40&md5=0a753747cd6baeee4c43cf8159577832>
- Silambarasan, T., & Raja, B. (2012). Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 679(1–3), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.040>
- Siqueira Silva, J. G., Rebellato, A. P., Greiner, R., & Lima Pallone, J. A. (2017). Bioaccessibility of calcium, iron and magnesium in residues of citrus and characterization of macronutrients. *Food Research International*, 97(December 2016), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.005>
- Sri Harsha, P. S. C., Gardana, C., Simonetti, P., Spigno, G., & Lavelli, V. (2013). Characterization of phenolics, in vitro reducing capacity and anti-glycation activity of red grape skins recovered from winemaking by-products. *Bioresource Technology*, 140, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.092>
- Sriamornsak, P., Wattanakorn, N., & Takeuchi, H. (2010). Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.018>
- Srivastava, P., & Malviya, R. (2011). Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - an overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(1), 10–18.
- Taguchi, Y., Arakawa, S., Saito, N., & Tanaka, M. (2015). Preparation of Microcapsules Containing Grape Polyphenol with the Spray Drying Method Followed by the Layer-by-Layer Method. *D Scientific Research Publishing*, (February), 56–64.
- Tamm, F., Härter, C., Brodkorb, A., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of whey protein hydrolysate/pectin complexes in emulsions and spray-dried microcapsules. *LWT*, 73, 524–527. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.06.053>
- Tantikitti, C. (2014). Feed palatability and the alternative protein sources in shrimp feed. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 36(1), 51–55.
- Tavarini, S., Ribuoli, M., Bimbatti, M., & Angelini, L. (2010). Functional components from *Stevia rebaudiana* Bert. leaves. *Journal of Biotechnology - J BIOTECHNOL*, 150, 326.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tho, I., Kjøniksen, A., Knudsen, K. D., & Nystro, B. (2006). Effect of solvent composition on

- the association behavior of pectin in methanol – water mixtures. *European Polymer Journal*, 42, 1164–1172. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.10.015>
- Thongkaew, C., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate-pectin coacervates. *Food Hydrocolloids*, 41, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.006>
- Tolun, A., Altintas, Z., & Artik, N. (2016). Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of Biotechnology*, 239, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001>
- Tomás-Barberan, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición Y Salud*, 10(2), 41–53.
- Ueno, H., Tanaka, M., Hosino, M., Sasaki, M., & Goto, M. (2008). Extraction of valuable compounds from the flavedo of Citrus junos using subcritical water. *Separation and Purification Technology*, 62(3), 513–516. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03.004>
- Valadez-Carmona, L., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2018). Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 131(June 2017), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.011>
- Valls Bellés, V. (2003). El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal: vitaminas y polifenoles. *Revista de Nutrición Clínica Y Dietética Hospitalaria*, 1(18), 1–9.
- Vasantha Rupasinghe, H. P., Wang, L., Huber, G. M., & Pitts, N. L. (2008). Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chemistry*, 107, 1217–1224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.057>
- Venkatesh, M. S., & Raghavan, G. S. V. (2004). An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials. *Biosystems Engineering*, 88(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2004.01.007>
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wang, L., Xu, H., Yuan, F., Pan, Q., Fan, R., & Gao, Y. (2015). Physicochemical characterization of five types of citrus dietary fibers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.02.003>
- Wang, M., Huang, B., Fan, C., Zhao, K., Hu, H., Xu, X., ... Liu, F. (2016). Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 794–803. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.011>
- Wang, S. Y., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(4), 1759–1768. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.134>

- Wang, W., Chen, W., Zou, M., Lv, R., Wang, D., Hou, F., ... Liu, D. (2018). Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. *Journal of Food Engineering*, 234, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.016>
- Wang, W., Ma, X., Jiang, P., Hu, L., Zhi, Z., Chen, J., ... Liu, D. (2016). Characterization of pectin from grapefruit peel : A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions. *Food Hydrocolloids*, 61, 730–739. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.019>
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., ... Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel : Optimization and comparison with the conventional method. *FOOD CHEMISTRY*, 178, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.080>
- Wang, W., Waterhouse, G. I. N., & Sun-Waterhouse, D. (2013). Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. *Food Research International*, 54(1), 837–851. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.038>
- Wang, W., Wu, X., Chantapakul, T., Wang, D., Zhang, S., Ma, X., ... Liu, D. (2017). Acoustic cavitation assisted extraction of pectin from waste grapefruit peels: A green two-stage approach and its general mechanism. *Food Research International*, 102(September), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.087>
- Warnakulasuriya, S., Pillai, P. K. S., Stone, A. K., & Nickerson, M. T. (2018). Effect of the degree of esterification and blockiness on the complex coacervation of pea protein isolate and commercial pectic polysaccharides. *Food Chemistry*, 264(May), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.036>
- Wicker, L., Kim, Y., Kim, M. J., Thirkield, B., Lin, Z., & Jung, J. (2014). Pectin as a bioactive polysaccharide - Extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids*, 42(P2), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.002>
- Wikiera, A., Mika, M., Starzynska-Janiszewska, A., & Stodolak, B. (2016). Endo-xylanase and endo-cellulase-assisted extraction of pectin from apple pomace. *Carbohydrate Polymers*, 142, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.063>
- Xu, S.-Y., Liu, J.-P., Huang, X., Du, L.-P., Shi, F.-L., Dong, R., ... Cheong, K.-L. (2018). Ultrasonic-microwave assisted extraction, characterization and biological activity of pectin from jackfruit peel. *LWT - Food Science and Technology*, 90(2017), 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.007>
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.004>
- Ye, Q., Georges, N., & Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science and Technology*, 78(January), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>
- Yeoh, S., Shi, J., & Langrish, T. A. G. (2008). *Comparisons between different techniques for*

- water-based extracted of pectin from orange peels. Desalination* (Vol. 218).
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.02.018>
- Yu, H., Yang, G., Sato, M., Yamaguchi, T., Nakano, T., & Xi, Y. (2017). Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. *Food Chemistry*, *232*, 379–386.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.004>
- Yuliarti, O., Matia-Merino, L., Goh, K. K. T., Mawson, J., Williams, M. A. K., & Brennan, C. (2015). Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. *Food Chemistry*, *166*, 479–485.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.055>
- Zakaria, S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Plants and Algae: Applications in Pharmaceutical and Food Ingredients. *Food Engineering Reviews*, *8*(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9119-x>
- Zanetti, M., Carniel, T. K., Dalcanton, F., Silva Dos Anjos, R., Riella, H. G., De Araújo, P. H. H., ... Fiori, M. A. (2018). Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review. *Trends in Food Science & Technology*, *81*(May 2017), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.003>
- Zegada Franco, V. Y. (2015). Extracción de pectina de residuos de cáscaras de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (HMO). *UPB - Investigación & Desarrollo*, *1*(15), 65–76.
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y., & Liu, D. (2013). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 222–231.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.021>
- Zhang, L., Zhou, C., Wang, B., Yagoub, A. E. G. A., Ma, H., Zhang, X., & Wu, M. (2017). Study of ultrasonic cavitation during extraction of the peanut oil at varying frequencies. *Ultrasonics Sonochemistry*, *37*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.034>
- Zhang, W., Xu, P., & Zhang, H. (2015). Pectin in cancer therapy : A review. *Food Science and Technology*, *44*, 258–271.
- Zhang, W., Xu, P., & Zhang, H. (2015). Pectin in cancer therapy: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *44*, 258–271. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224415000941>
- Zouambia, Y., Ettoumi, K. Y., Krea, M., & Moulai-Mostefa, N. (2017). A new approach for pectin extraction : Electromagnetic induction heating. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, 480–487.

12. Anexos

ANEXO 1. Tablas de análisis de varianza del diseño factorial para la extracción de pectina de harinas cítricas

ANOVA extracción de pectina de toronja

Análisis de Varianza para Rendimiento

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:AMPLITUD | 20.7244 | 1 | 20.7244 | 12.96 | 0.0029 |
| B:TIEMPO | 6.60056 | 1 | 6.60056 | 4.13 | 0.0616 |
| AB | 0.969008 | 1 | 0.969008 | 0.61 | 0.4492 |
| Error total | 22.3814 | 14 | 1.59867 | | |
| Total (corr.) | 50.6754 | 17 | | | |

R-cuadrada = 55.8338 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 46.3696 por ciento

Error estándar del est. = 1.26439

Error absoluto medio = 0.955432

Estadístico Durbin-Watson = 1.43371 (P=0.1634)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.23406

Análisis de Varianza para Rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:AMPLITUD | 31.1035 | 2 | 15.5518 | 15.74 | 0.0004 |
| B:TIEMPO | 6.60056 | 1 | 6.60056 | 6.68 | 0.0239 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 1.11468 | 2 | 0.557339 | 0.56 | 0.5833 |
| RESIDUOS | 11.8566 | 12 | 0.98805 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 50.6754 | 17 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

ANOVA extracción de pectina de mandarina

Análisis de Varianza para Rendimiento

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Amplitud | 2.58781 | 1 | 2.58781 | 2.33 | 0.1654 |
| B:Tiempo | 0.175208 | 1 | 0.175208 | 0.16 | 0.7016 |
| AB | 0.0153125 | 1 | 0.0153125 | 0.01 | 0.9094 |
| Error total | 8.88216 | 8 | 1.11027 | | |
| Total (corr.) | 11.6605 | 11 | | | |

R-cuadrada = 23.8269 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0.0 por ciento

Error estándar del est. = 1.05369

Error absoluto medio = 0.758472

Estadístico Durbin-Watson = 2.12342 (P=0.4524)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.139155

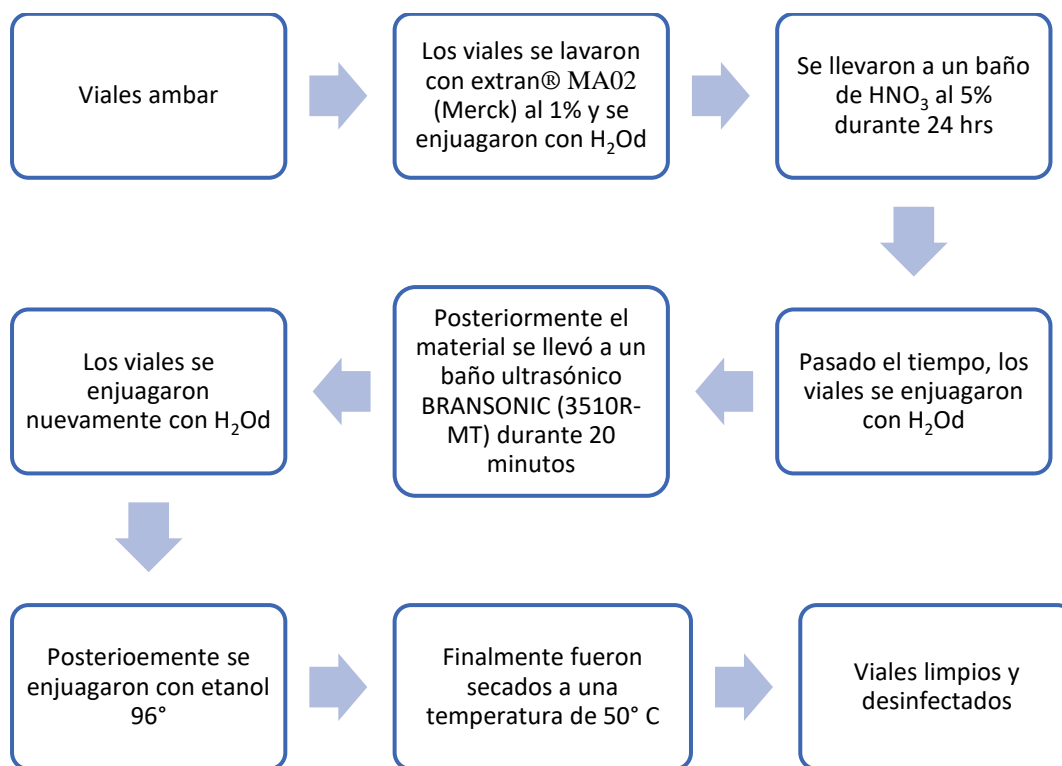
Análisis de Varianza para Rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Amplitud | 2.70682 | 2 | 1.35341 | 0.97 | 0.4309 |
| B: Tiempo | 0.175208 | 1 | 0.175208 | 0.13 | 0.7349 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 0.423517 | 2 | 0.211758 | 0.15 | 0.8621 |
| RESIDUOS | 8.35495 | 6 | 1.39249 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 11.6605 | 11 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

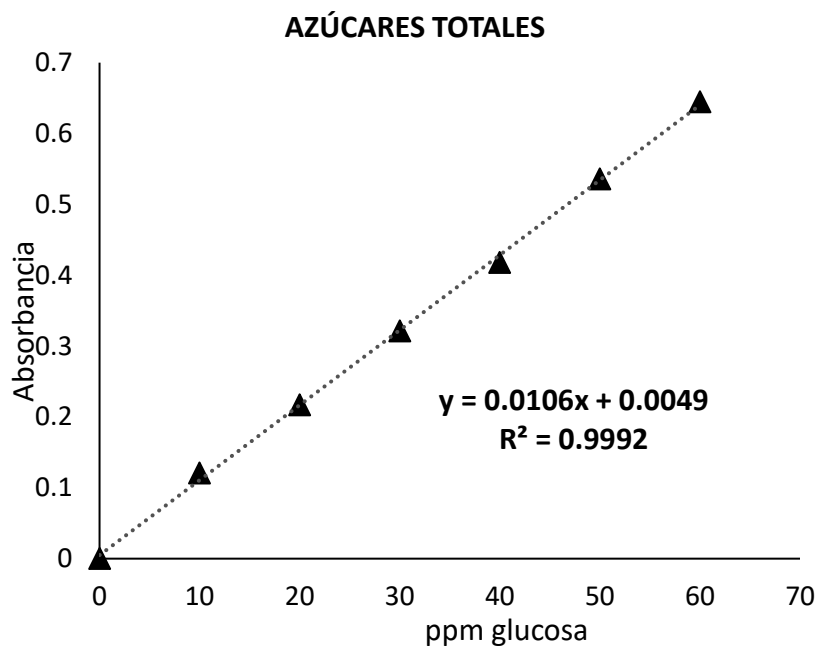
ANEXO 2. Protocolo de lavado y desinfección del material

Se utilizaron viales ámbar de 3 mL para las determinaciones de las propiedades antioxidantes en las muestras que lo requirieran, el proceso que siguieron estos materiales se describe a continuación.

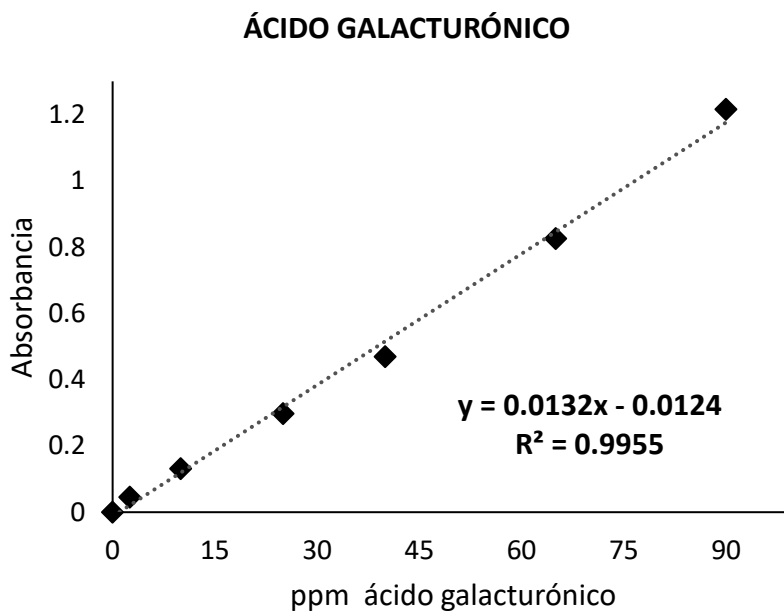


ANEXO 3. Curvas de calibración

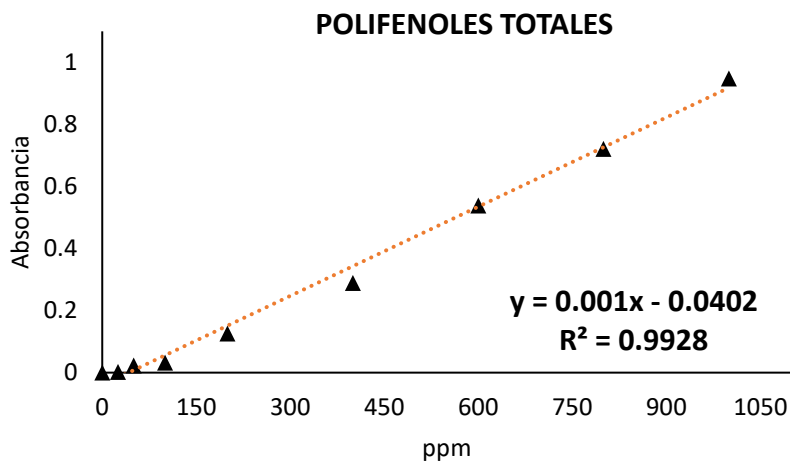
Curva de calibración de azúcares totales, expresando la concentración en ppm de glucosa contra la absorbancia de los estándares de 0-60 ppm del analíto.



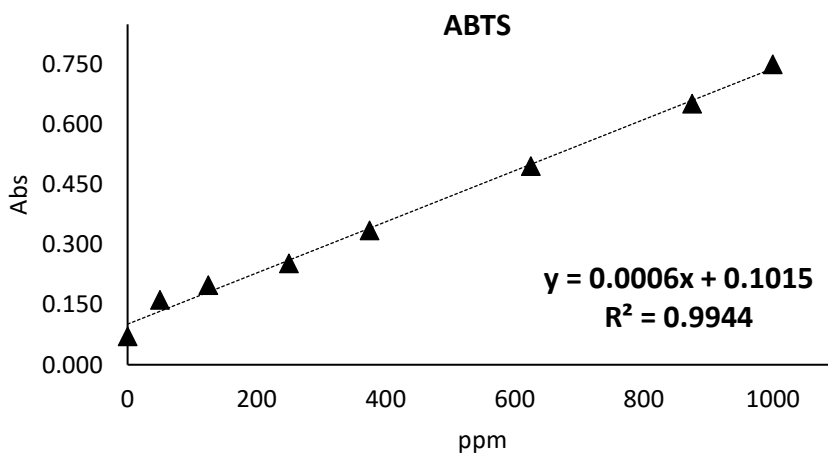
Curva de calibración de ácido galacturónico, expresando la concentración en ppm de ácido galacturónico contra la absorbancia de los estándares de 0-90 ppm del analíto.



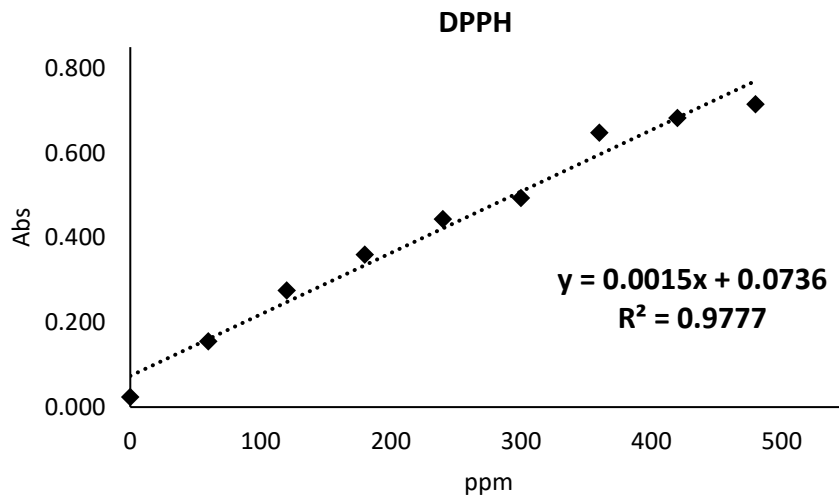
Curva de calibración de polifenoles totales por el método espectrofotométrico, expresando la concentración en ppm de gálico (mEq ácido gálico/L) contra la absorbancia de los estándares.



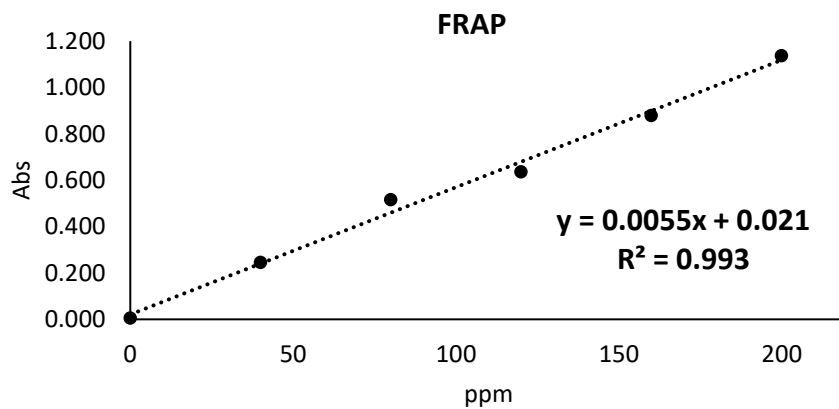
Curva de calibración de ABTS•, expresando la concentración en ppm de trolox (mEq Trolox/L) contra la absorbancia de los estándares.



Curva de calibración de DPPH•, expresando la concentración en ppm de trolox (mEq Trolox/L) contra la absorbancia de los estándares.



Curva de calibración de FRAP, expresando la concentración en ppm de Trolox (mEq trolox/L) contra la absorbancia de los estándares.



ANEXO 4. Tablas de análisis de varianza del diseño factorial utilizado para determinar el %Ef-cap de las pectinas cítricas.

Análisis de Varianza para %Ef-cap

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Pectina | 13.9128 | 1 | 13.9128 | 27.82 | 0.0133 |
| B:Extracción | 10.3285 | 1 | 10.3285 | 20.65 | 0.0200 |
| AB | 1.33661 | 1 | 1.33661 | 2.67 | 0.2006 |
| bloques | 0.0153125 | 1 | 0.0153125 | 0.03 | 0.8722 |
| Error total | 1.50044 | 3 | 0.500146 | | |
| Total (corr.) | 27.0937 | 7 | | | |

R-cuadrada = 94.462 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 87.0781 por ciento

Error estándar del est. = 0.70721

Error absoluto medio = 0.40875

Estadístico Durbin-Watson = 2.59775 (P=0.6933)

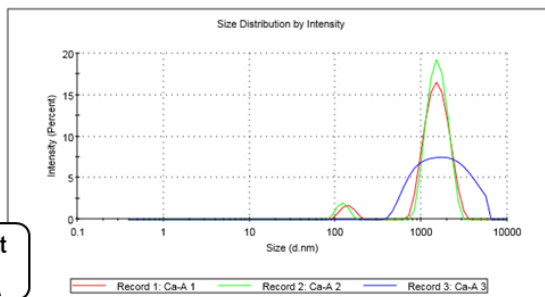
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.415928

ANEXO 5. Graficas de distribución de tamaño de partícula de los polvos.

Results

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.n...) |
|-------------------------------|----------------------|--------------|-----------------|
| Z-Average (d.nm): 1266 | Peak 1: 1571 | 94.2 | 485.6 |
| Pdl: 0.380 | Peak 2: 139.9 | 5.8 | 24.67 |
| Intercept: 0.963 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |

Result quality : **Refer to quality report**

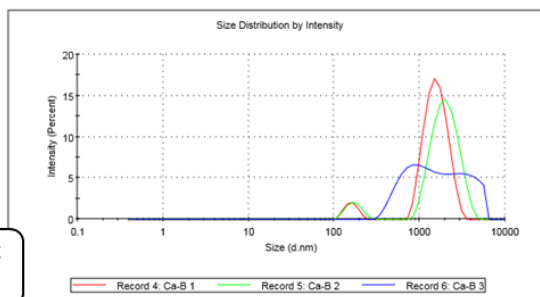


Trat
AA

Results

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.n...) |
|-------------------------------|----------------------|--------------|-----------------|
| Z-Average (d.nm): 1182 | Peak 1: 1600 | 93.2 | 474.5 |
| Pdl: 0.426 | Peak 2: 159.1 | 6.8 | 27.40 |
| Intercept: 0.972 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |

Result quality : **Refer to quality report**

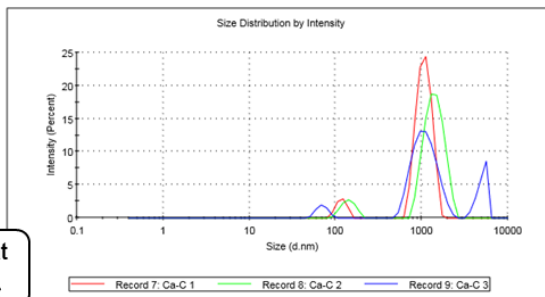


Trat
BB

Results

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.n...) |
|-------------------------------|----------------------|--------------|-----------------|
| Z-Average (d.nm): 1373 | Peak 1: 1074 | 92.2 | 210.4 |
| Pdl: 0.559 | Peak 2: 117.4 | 7.8 | 15.52 |
| Intercept: 0.992 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |

Result quality : **Refer to quality report**



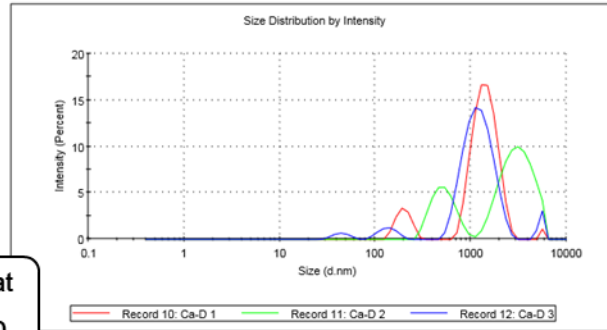
Trat
CC

Results

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|------------------------|---------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 1158 | Peak 1: 1435 | 87.7 | 399.9 |
| PdI: 0.465 | Peak 2: 199.5 | 11.2 | 35.00 |
| Intercept: 0.967 | Peak 3: 5560 | 1.1 | 0.000 |

Result quality : Refer to quality report

Trat
DD

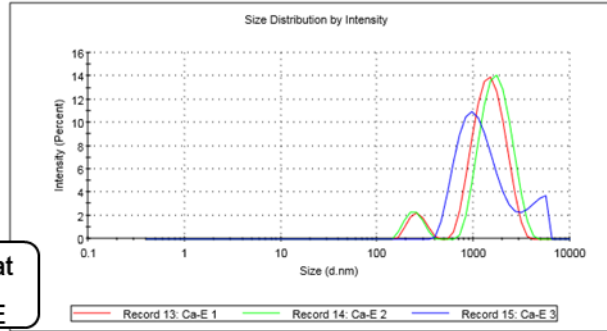


Results

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|-------------------------|---------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 996.3 | Peak 1: 1525 | 91.6 | 543.6 |
| PdI: 0.330 | Peak 2: 261.2 | 8.4 | 52.43 |
| Intercept: 0.954 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |

Result quality : Refer to quality report

Trat
EE

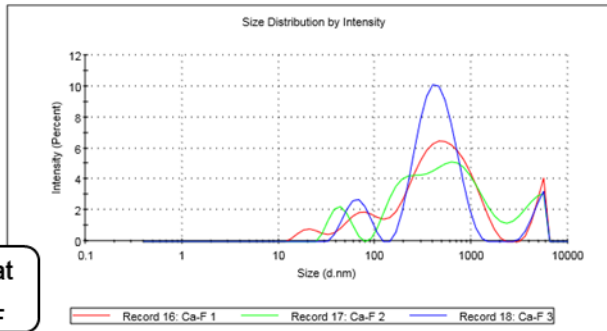


Results

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|-------------------------|---------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 294.5 | Peak 1: 572.9 | 74.9 | 351.5 |
| PdI: 0.767 | Peak 2: 76.16 | 13.0 | 25.84 |
| Intercept: 0.969 | Peak 3: 5021 | 8.2 | 601.3 |

Result quality : Refer to quality report

Trat
FF



ANEXO 6. Productividad

Participación en congresos



La Universidad Autónoma de Guadalajara
a través del
Decanato de Diseño, Ciencia y Tecnología

otorga el presente

Reconocimiento

Martínez-Castillo J, Polanco-Lugo E, Pacheco-López N, y Ayora-Talavera T

por la presentación en formato CARTEL del trabajo titulado

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE PECTINA A PARTIR DE RESIDUOS DE TORONJA Y MANDARINA

en el **6° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía**

"Ciencia e innovación para la Salud", llevado a cabo del 27 al 29 de septiembre.

Zapopan, Jalisco, México, 29 de septiembre de 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tomas Ornelas Salas', written over a horizontal line.

MSC. Tomas Ornelas Salas
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando Gabriel Cinco Castellanos', written over a horizontal line.

MVZ Fernando Gabriel Cinco Castellanos
Director de la Facultad de Ciencias Biológico Agropecuarias



La Universidad Autónoma de Guadalajara
a través del
Decanato de Diseño, Ciencia y Tecnología

otorga el presente
Reconocimiento

Hernández-Hernández M, Polanco-Lugo E, Martínez-Castillo J, Pacheco-López N, y Ayora-Talavera T

por la presentación en formato CARTEL del trabajo titulado

ENCAPSULACIÓN POR GELIFICACIÓN IÓNICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE STEVIA REBAUDIANA BERTONI CON ALGINATO DE SODIO Y MUCÍLAGO DE CHÍA (SALVIA HISPANICA)

en el **6° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía**

"Ciencia e innovación para la Salud", llevado a cabo del 27 al 29 de septiembre.

Zapopan, Jalisco, México, 29 de septiembre de 2017.

MSC. Tomas Ornelas Salas
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

MVZ Fernando Gabriel Cinco Castellanos
Director de la Facultad de Ciencias Biológico Agropecuarias



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

It is certified, that:

José Isabel Martínez-Castillo; Erik Manuel de Atocha Polanco-Lugo; Juan Carlos Cuevas-Bernardino ; Nelth Aracely Pacheco-López ; Teresa del Rosario Ayora Talavera

Authors of the work:

PHYSICOCHEMICAL, FUNCTIONAL AND RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PECTIN OF Citrus paradisi AND Citrus reticulata WASTE

Keyword: ADN379JOS20180131

Participated in the **poster** session of the X International Congress, XXI National Congress on Biochemical Engineering and the XVI Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, held at 21st Century Convention Center, Mérida, Yucatán, México from March, 21st to 23th 2018.

Raúl Chávez Alviricio, IBQ
President



Deifilia Ahuatzacón, PhD
Chair Scientific Committee

Publicaciones



EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE PECTINA A PARTIR DE RESIDUOS DE TORONJA Y MANDARINA.

Martínez-Castillo, J.I., Polanco-Lugo, E.M.A., González-Flores, T., Pacheco-López, N.A, y *Ayora-Talavera, T.R.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad Sureste, Tablaje Catastral 31264, Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto Km 5.5, Parque Científico Tecnológico de Yucatán, CP: 97302, Mérida, Yucatán, México.

*Autor para correspondencia: tayora@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La pectina es un biopolímero usado en la industria alimentaria por sus propiedades tecno-funcionales, la técnica convencional para extraer pectina afecta sus propiedades; por lo que existen métodos alternativos de extracción. El objetivo fue evaluar el efecto de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) en las propiedades fisicoquímicas de las pectinas de toronja y mandarina. La extracción se realizó en proporción 1:50 (w/v) con ácido cítrico, a 80°C con una sonda ultrasónica a 20kHz de frecuencia y 130W de potencia. Se utilizó un diseño 2^2 para cada una de las pectinas; se evaluaron 2 amplitudes (80 y 90%) a 2 tiempos de extracción (15 y 30 min.); las variables de respuesta fueron el grado de esterificación y el rendimiento de extracción. Los rendimientos de extracción de pectina de toronja estuvieron 14-18%; mientras que los de mandarina entre 8-13%, además fueron pectinas de alto metoxilo, ya que el grado de esterificación de pectina de toronja estuvo entre 65-72%, mientras que en la de mandarina entre 64-70%. La EAU resultó ser eficaz en la extracción de pectinas de toronja y mandarina debido al rendimiento y propiedades obtenidas similares al método convencional, pero con una reducción de tiempo y reactivos.

Palabras clave: Pectina; cítricos; extracción asistida por ultrasonido.



INTRODUCCIÓN

La pectina es una sustancia encontrada en la pared celular de algunas plantas, en donde se considera el polisacárido más complejo por su estructura y funcionalidad. Este biopolímero participa en el crecimiento, morfología, desarrollo y defensa de las plantas; y además sirve como agente gelificante y estabilizador en diversos alimentos; también teniendo efectos positivos sobre la salud humana y, por tanto, múltiples usos biomédicos [1]. Principalmente, las aplicaciones de la pectina en los alimentos están determinadas por sus características químicas como el contenido de ácido galacturónico, el contenido de metoxilo, el grado de esterificación y el valor de acetilo [2].

Dichas características, están estrechamente relacionadas con su estructura, y esta a su vez con el método de extracción, poniendo de manifiesto la importancia estructural de la pectina, la cual fue descrita por Koubala y colaboradores (2008) [3] como una cadena lineal de unidades de ácido galacturónico unidos mediante enlaces covalentes que constituyen tres co-polímeros: el

Article

Antioxidant Capacity and UPLC-PDA ESI-MS Phenolic Profile of *Stevia rebaudiana* Dry Powder Extracts Obtained by Ultrasound Assisted Extraction

Ana G. Covarrubias-Cárdenas¹, José Isabel Martínez-Castillo¹, Nelly Medina-Torres¹,
Teresa Ayora-Talavera¹ , Hugo Espinosa-Andrews², N. Ulises García-Cruz³
and Neith Pacheco^{1,*} 

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Sureste, Mérida 97070, Mexico; ancovarrubiasal@ciatej.edu.mx (A.G.C.-C.); jomartinez_al@ciatej.edu.mx (J.I.M.-C.); apachecol@hotmail.com (N.M.-T.); tayora@ciatej.mx (T.A.-T.)

² CIATEJ Unidad Zapopan, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan Jalisco 45019, Mexico; hespinosa@ciatej.mx

³ Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mérida 97310, Mexico; norbertoulisesg@gmail.com

* Correspondence: npacheco@ciatej.mx; Tel.: +52-(33)-33455200 (ext. 4024)

Received: 24 July 2018; Accepted: 27 August 2018; Published: 31 August 2018



Abstract: Stevia leaves, which are commonly used as a natural sweetener in food products, have increased in importance for antioxidant delivery due to their high content of phenolic compounds. In this study, the influence of the drying process on stevia leaves, with regards to phenolic content and antioxidant activity during drying kinetics 40 °C for 7 h, was studied. The effect of solvent concentration and extraction time using a 3² factorial design on total phenol content (TPC), and on antioxidant activity of extracts obtained from dried stevia leaves, by ultrasound assisted extraction (UAE) as alternative method was evaluated. Steviol glycosides contents were also evaluated by a conventional and UAE method. Phenols identification, quantification and purification were performed by Ultra Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry (UPLC–ESI–MS), Ultra Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array (UPLC–PDA) and advanced automated flash purification, respectively. Drying time affected the moisture content of stevia leaves. A constant weight was reached after six hours of drying, and higher antioxidant activity was observed, while the highest TPC was obtained after seven hours of drying. The highest TPC (91.57 ± 8.8 mg GAE/g dw) and antioxidant activity (603.24 ± 3.5 µmol TE/g dw) in UAE method was obtained when ethanol 50% at 5 min was used. Steviol glycosides extracted by UAE were recorded with a content of 93.18 ± 1.36 mg/g dw and 98.97 ± 1.75 mg/g dw for stevioside and rebaudioside A respectively. Six phenolic compounds including four phenolic acids and two flavonoids were identified and quantified by UPLC–PDA, and confirmed by ESI–MS reporting its fragmentation pattern. Diosmin and chlorogenic acid were the most abundant compounds with values of 2032.36 µg/mL and 434.95 µg/mL respectively. As a novelty we found that the antioxidant activity evaluated in partially purified fractions suggested that biological activity might be attributed to the synergistic effect of the six phenols present in the stevia leaves extract. In addition to its sweetening properties, stevia leaves constitute a potential source of polyphenolic compounds, with antioxidant activity that could be used as a food additive.