

Evaluación de proteínas aisladas de fuentes vegetales como agentes encapsulantes del extracto de semillas de annatto



Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Estudiante:

JULIÁN QUINTERO QUIROZ
Julian.quintero@udea.edu.co

Tutor:

JHON JAIRO ROJAS CAMARGO
Ph.D. en Farmacia (Universidad de Iowa)
Grupo Diseño y Formulación de Medicamentos, Cosméticos y Afines
jhon.rojas@udea.edu.co

Cotutor:

GELMY LUZ CIRO GOMEZ
Ingeniera de Alimentos, Ph.D. en Ingeniería
Grupo Programa Ofidismo/Escorpionismo
gelmy.ciro@udea.edu.co

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS
MEDELLÍN**

2019



Le agradezco primeramente a Dios por permitirme vivir, disfrutar, sobrellevar y aprender de esta gran experiencia que es hacer un doctorado.

Además le agradezco a Dios que me permitió vivir esta experiencia de principio a fin rodeado de los seres que amo; mi familia (mi madre, mis hermanos y mi cuñada y cuñado), mis amigos y de quien era en esos primeros años mi novia y que ahora es mi amada esposa. Muchas gracias por todo el apoyo, las palabras de aliento y a ti mi amada esposa por ser mi palanca.

Un especial agradecimiento a mis tutores el Dr. John Rojas y la Dra. Gelmy Ciro por compartirme sus conocimientos y ponerme retos a diario que me llevaron a crecer como persona y profesional, a Ana M. Naranjo por el apoyo incondicional que me dio; a Angélica Celis y Luisa Muñoz por el gran equipo que conformamos.

A todos mis compañeros de laboratorio que estuvieron ahí para ayudarme, guiarme y darme una palabra de aliento para continuar en este proceso, muchas gracias.

Por último, una especial dedicatoria mis dos guías de vida; mi madre, que siempre está ahí para aconsejarme y a mi padre, que sé que me acompaña y me guía desde el “cielo”.

Contenido

LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	13
2.1. Extracto de semillas de annatto (<i>Bixa orellana</i> L.).....	13
2.2. Encapsulación de compuestos bioactivos.....	16
2.2.1. Encapsulación de compuestos activos por gelación iónica.....	18
2.3. Proteínas como materiales de recubrimiento.....	19
2.4. Modificaciones estructurales de proteínas vegetales.....	23
2.4.1. Hidrólisis enzimática de proteínas vegetales.....	23
2.4.2. N-acilación de proteínas.....	24
2.4.3. N-cationización de proteínas.....	24
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos específicos.....	25
5. METODOLOGÍA.....	26
5.1. Extracción asistida por microondas y ultrasonido de los compuestos bioactivos de las semillas de annatto.....	26
5.1.1. Materiales.....	26
5.1.2. Diseño experimental.....	26
5.1.3. Caracterización de los extractos de semillas de annatto optimizados.....	29
5.2. Extracción de proteínas de quinua, lentejas y frijón negro.....	30
5.2.1. Materiales.....	30
5.2.2. Caracterización fisicoquímica de las fuentes vegetales.....	30
5.2.3. Diseño experimental aplicado en la extracción asistida por ultrasonido de proteínas (UAPE) de fuentes vegetales.....	31
5.3. Estandarización del proceso de encapsulación por gelación iónica con proteínas vegetales como material de recubrimiento.....	35
5.4. Modificación estructural de las proteínas vegetales y evaluación de su capacidad encapsulante por gelación iónica.....	36
5.4.1. Modificación estructural de proteínas.....	36
5.4.2. Caracterización fisicoquímica y propiedades funcionales de las proteínas modificadas.....	38

5.4.3. Determinación de la capacidad encapsulante de las proteínas modificadas.	39
5.4.4. Análisis estadístico.	40
5.5. Encapsulación y estabilidad del extracto de annatto por gelación iónica empleando proteínas vegetales como material de recubrimiento.	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
6.1. Extracción asistida por microondas y ultrasonido de los compuestos bioactivos presentes en las semillas de annatto (Anexo 1 y 2).....	43
6.1.1. Diseño experimental para la optimización de MAE y UAE.	43
6.1.2. Efecto de UAE y MAE sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto de semillas de annatto.....	49
6.2. Extracción asistida por ultrasonido de proteínas vegetales y caracterización de propiedades fisicoquímicas y funcionales (Anexo 3).....	50
6.2.1. Composición química del material vegetal.	50
6.2.2. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de proteína (UAEP).....	50
6.2.3. Contenido de aminoácidos (AA) de las proteínas extraídas.....	53
6.2.4. Caracterización de las proteínas obtenidas por UAPE y PE optimizados.....	55
6.2.5. Análisis multivariado de las propiedades funcionales de las proteínas extraídas.....	58
6.3. Estandarización del proceso de encapsulación por gelación iónica con proteínas vegetales como material de recubrimiento (Anexo 4).....	59
6.3.1. Estudio reológico como herramienta de estandarización de condiciones de concentración, pH, temperatura de gelación y presencia de iones Ca^{2+}	59
6.3.2. Definición de las condiciones del proceso de encapsulación por gelación iónica.	69
6.4. Modificación estructural de las proteínas vegetales y evaluación de la capacidad encapsulante por gelación iónica (Anexo 5).....	73
6.4.1. Modificación de las proteínas nativas.....	73
6.4.2. Caracterización estructural y de propiedades funcionales de las proteínas nativas y modificadas.....	74
6.4.2. Encapsulación por gelación iónica usando las proteínas nativas y modificadas	90
6.5. Encapsulación y estabilidad del extracto de annatto por gelación iónica utilizando proteínas aisladas como material de recubrimiento (Anexo 6).	93
6.5.1. <i>Estudios de estabilidad del extracto de semilla de annatto encapsulado.</i>	<i>98</i>
7. CONCLUSIONES.....	103
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
9. ARTICULOS PRODUCTO DE LA INVESTIGACIÓN (ANEXOS).....	115

- Anexo 1.** Quiroz, J. Q., Torres, A. C., Ramirez, L. M., Garcia, M. S., Gomez, G. C., & Rojas, J. (2019). Optimization of the Microwave-Assisted Extraction Process of Bioactive Compounds from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, 8(2), 37. 115
- Anexo 2.** Quintero Quiroz, J., Naranjo Duran, A. M., Silva Garcia, M., Gomez, C., Luz, G., & Rojas Camargo, J. J. (2019). Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis. *International Journal of Food Science*, 2019..... 115
- Anexo 3.** Isolation, structural characterization, and assessment of functional properties of quinoa, black bean and lentil proteins extracted by ultrasound. *Proceso de prensa en Journal of food science and technology* 115
- Anexo 4.** Effect of the concentration, pH, and Ca²⁺ ions on the rheological properties of isolate proteins from quinoa, lentil, and black bean. *Sometido a la revista Foods* 115
- Anexo 5.** Effect of the structural modification in vegetable proteins as microencapsulating agents of the achiote seed extract (*Bixa orellana* L.). 115
- Anexo 6.** Quintero Quiroz, J., Velazquez, V., Corrales-Garcia, L. L., Torres, J. D., Delgado, E., Ciro, G., & Rojas, J. (2020). Use of Plant Proteins as Microencapsulating Agents of Bioactive Compounds Extracted from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, 9(4), 310. 115
- Anexo 7.** Quintero, J., Rojas, J., & Ciro, G. (2018). Vegetable proteins as potential encapsulation agents: a review. *Food Res*, 2(3), 208-220. 115
- Anexo 8.** Quintero, J., Naranjo, A., Ciro, G., & Rojas, J. (2017). Vegetable Proteins: Non-sensitizing Encapsulation Agents for Bioactive Compounds. *London, United Kingdom: In Tech*, 43-65..... 115
- Anexo 9.** Quintero-Quiroz, J., & Rojas, J. (2018). Proteins functionalization: a strategy that boost the performance of these macromolecules for innovative pharmaceutical and food developments. *Vitae*, 25(1), 6-7. 115

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Estudios reportados de encapsulación de activos usando proteínas vegetales como materiales de recubrimiento.	21
Tabla 2. Niveles de las variables independientes acorde a BBD para MAE y UAE.	26
Tabla 3. Matriz experimental para MAE y UAE del extracto de semillas de annatto.	26
Tabla 4. Matriz experimental aplicada en la extracción de proteínas de cada una de las fuentes vegetales quinua, lentejas y frijol negro.	31
Tabla 5. Matriz experimental y contenido de compuestos polifenólicos y bixina para MAE y UAE del extracto de semillas de annatto.	43
Tabla 6. Tabla ANOVA para el diseño de experimentos de la MAE y UAE de compuestos bioactivos del extracto de semillas de annatto.	44
Tabla 7. Predicción de las condiciones optimizadas para la MAE y UAE aplicando un diseño experimental tipo Box-Behnken.	48
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) a diferentes pH contra <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i> y actividad antioxidante de los extractos obtenidos por MAE, UAE y lixiviación.	49
Tabla 9. Matriz experimental para la UAPE de quinua, lentejas y frijoles negros según el diseño experimental Box-Behnken.	50
Tabla 10. Caracterización de proteínas de quinua, frijol negro y lentejas obtenidas por UAPE y PE optimizados.	55
Tabla 11. Resumen de ANOVA que muestra los resultados estadísticos de los parámetros reológicos con respecto a los parámetros de las soluciones proteicas.	69
Tabla 12. Matriz experimental para la determinación del pH y tiempo de tratamiento térmico para el mecanismo de encapsulación por gelación iónica.	70
Tabla 13. Grado de modificación de proteínas nativas.	74
Tabla 14. Temperaturas de evaporación y desnaturalización de las proteínas de soya, quinua y lentejas nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.	79
Tabla 15. Propiedades de proteínas de soya nativa y modificada por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.	82
Tabla 16. Propiedades de proteínas de quinua nativa y modificada por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.	82
Tabla 17. Propiedades de proteínas de lenteja nativa y modificada por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.	83
Tabla 18. Comparación de la eficiencia de encapsulación de las proteínas de soya, quinua y lentejas nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática para el extracto de annatto y el colorante hidrofílico.	90
Tabla 19. ANOVA multifactorial sobre la eficiencia de encapsulación de los polifenoles totales y bixina presentes en el extracto de annatto.	91
Tabla 20. Comparación de la eficiencia de encapsulación y del tamaño de partícula del extracto de annatto encapsulado empleando las diferentes proteínas.	93
Tabla 21. Comparación de la actividad antioxidante del extracto de annatto libre y encapsulado almacenado en diferentes condiciones.	101

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Principales compuestos bioactivos presentes en el extracto de semillas de annatto (4)..... 14
- Figura 2.** Proceso de formación de hidrogeles entre el alginato de sodio y el ion polivalente Ca^{2+} por gelación iónica..... 19
- Figura 3.** Mecanismos de reacción de algunas modificaciones estructurales utilizadas en proteínas: (A.) Reacción de N-acilación, (B.) Reacción de N-cationización. 25
- Figura 4.** Esquema de sistemas de extracción (a) para la extracción asistida por microondas (MAE); (b) para la extracción asistida por ultrasonido (UAE). 28
- Figura 5.** Gráficas de superficie de respuestas para los efectos significativos de: (a) relación solvente-semillas vs tiempo de MAE para el contenido de compuestos polifenólicos extraídos, (b) concentración del solvente vs tiempo de MAE para el rendimiento de bixina extraído, (c) relación solvente-semillas vs tiempo de UAE para el contenido de compuestos polifenólicos extraídos y (d) concentración del solvente vs tiempo de UAE para el rendimiento de bixina extraído. 47
- Figura 6.** (Panel A) Tabla ANOVA para el rendimiento de proteínas de cada fuente. (Panel B) Gráficos de superficie de respuesta para los efectos de la relación de tampón a material frente al tiempo de ultrasonido sobre el rendimiento de proteínas de: (a) lentejas, (b) quinua y (c) frijol negro. 53
- Figura 7.** Composición de aminoácidos de las proteínas de quinua, frijol negro y lentejas (g/100 g de aislado de proteína)..... 54
- Figura 8.** SDS-PAGE de proteínas de quinua, frijoles negros y lentejas con UAPE y sin tratamiento por ultrasonido (PE). MW: peso molecular. 56
- Figura 9.** Variación del módulo de almacenamiento (G') con el tiempo en una prueba de rampa de temperatura de proteínas de quinua (azul), frijol negro (negro) y lenteja (rojo) obtenidas por UAPE (cuadro relleno): proteínas extraídas con ultrasonido y PE (cuadro vacío): proteínas extraídas sin ultrasonido. 57
- Figura 10.** Análisis multivariado para el proceso de extracción y caracterización de quinua, frijol negro y proteínas de lentejas: (A) dendrograma, (B) bigráfico de PCA y (C) Variables con correlación significativa. EY: Rendimiento de extracción, MW: peso molecular, IP: punto isoeléctrico, SH: grupos tiol, WHC: capacidad de retención de agua, FAC: Capacidad de absorción de grasa, EAI: índice de actividad emulsionante, ESI: índice de estabilidad emulsionante, Tgel: Temperatura de gelificación. 58
- Figura 11.** Efecto de la concentración de proteína y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijol negro (BP) y lentejas (LP) con tratamiento térmico (CTT) y sin tratamiento térmico (STT). (a) promedio del comportamiento de flujo (n); (b) promedio del índice de consistencia (K); (c) promedio del módulo de almacenamiento (G') de los barridos de frecuencia; (d) promedio del ángulo de desfase (δ) de los barridos de frecuencia. 60
- Figura 12.** Efecto de la concentración de proteína y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijol negro (BP) y lentejas (LP). (a) módulo de almacenamiento (G') obtenido en el barrido de temperatura; (b) ángulo de desfase (δ) obtenido en el barrido de temperatura..... 62
- Figura 13.** Efecto del pH y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijol negro (BP) y lentejas (LP) con tratamiento térmico (CTT) y sin tratamiento térmico (STT). (a) promedio del comportamiento de flujo (n); (b) promedio del índice de consistencia (K); (c) promedio del módulo de almacenamiento

(G') de los barridos de frecuencia; (d) promedio del ángulo de desfase (δ) de los barridos de frecuencia. 64

Figura 14. Efecto del pH y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijol negro (BP) y lentejas (LP). (a) módulo de almacenamiento (G') obtenido en el barrido de temperatura; (b) ángulo de desfase (δ) obtenido en el barrido de temperatura. 66

Figura 15. Efecto del CaCl₂ y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijol negro (BP) y lentejas (LP) con tratamiento térmico (CTT) y sin tratamiento térmico (STT). (a) promedio del comportamiento de flujo (n); (b) promedio del índice de consistencia (K); (c) promedio del módulo de almacenamiento (G') de los barridos de frecuencia; (d) promedio del ángulo de desfase (δ) de los barridos de frecuencia. 68

Figura 16. Efecto del CaCl₂ y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijol negro (BP) y lentejas (LP). (a) módulo de almacenamiento (G') obtenido en el barrido de temperatura de las soluciones de cada aislado proteico estudiado; (b) ángulo de desfase (δ) obtenido en el barrido de temperatura de las soluciones de cada aislado proteico estudiado. 68

Figura 17. Formación de minicápsulas con (a) proteínas de frijol negro; (b) proteínas de lentejas; (c) proteínas de quinua; (d) proteínas de soya; (e) caseinato de sodio. 72

Figura 18. Flujograma del proceso de encapsulación por gelación iónica, empleando proteínas como material de recubrimiento. 73

Figura 19. Espectro FT-IR y contenido de plegamientos (d) (hélices- α , hojas β , randol coll y plegamientos) en la estructura secundaria de las proteínas nativas (y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática de soya (a), quinua (b) y lentejas (c). NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSCP: caseinato de sodio N-catinizado, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min. 76

Figura 20. Termograma de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) del caseinato de sodio y proteínas de quinua, lentejas y soya nativas. NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, Td₁: temperatura de desnaturalización, Td₂: temperatura de degradación. 78

Figura 21. Efecto del pH en el perfil de solubilidad de las proteínas de soya (a), quinua (b) y lentejas (c) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática; NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min. 80

Figura 22. SDS-PAGE de las proteínas de soya (a), quinua (b) y lentejas (c) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática; NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSCP: caseinato de sodio N-catinizado, CSP:

- proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min. 84
- Figura 23.** Módulo de almacenamiento (G') y ángulo de desfase (δ) al inicio y al final del barrido de temperatura para las proteínas de soya (a y b), quinua (c y d) y lentejas (e y f) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática. NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSCP: caseinato de sodio N-catinizado, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min. 88
- Figura 24.** Módulo de almacenamiento (G') y ángulo de desfase (δ) al inicio y al final del barrido de frecuencia para las proteínas de soya (a y b), quinua (c y d) y lentejas (e y f) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática. NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min. 89
- Figura 25.** Prueba de LSD de Fisher con un 95% de confianza para: a) Eficiencia de encapsulación (EE) con respecto a la fuente de proteína; b) EE con respecto al mecanismo de modificadas de las proteínas; c) EE con respecto al activo a encapsular..... 92
- Figura 26.** Espectro FT-IR de los diferentes materiales: A. proteínas empleadas como material de recubrimiento, B. extracto de annatto encapsulado con las diferentes proteínas como material de recubrimiento C. extracto de annatto libre. FE: extracto libre, LP: proteína de lentejas, QP: proteína de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteína de soya..... 95
- Figura 27.** Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) de extracto de annatto libre y encapsulado. A. espectro de fluorescencia; B. extracto encapsulado con proteínas de lentejas, C. extracto encapsulado con proteínas de quinua, D. extracto encapsulado con caseinato de sodio, E. extracto encapsulado con proteínas de soja. FE: extracto libre, LP: proteína de lentejas, QP: proteína de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteína de soja. 98
- Figura 28.** Escaneo de microfotografías electrónicas de extracto de annatto libre y encapsulado: A. extracto encapsulado con proteínas de lentejas, B. extracto encapsulado con proteínas de quinua, C. extracto encapsulado con caseinato de sodio, y D. extracto encapsulado con proteínas de soja..... 98
- Figura 29.** Efecto del tiempo de almacenamiento y la temperatura de la bixina aislado del extracto de annatto libre y encapsulado. (a) Extracto libre y encapsulado con proteínas de lentejas, (b) extracto libre y encapsulado con proteínas de quinua, (c) extracto libre y encapsulado con caseinato de sodio, (d) extracto libre y encapsulado con proteínas de soja. FE: extracto libre, LP: proteínas de lentejas, QP: proteínas de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteínas de soja. * Las muestras marcadas con "*" no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). 99
- Figura 30.** Efecto del tiempo de almacenamiento y la temperatura de los compuestos fenólicos aislados del extracto de annatto libre y encapsulado. (a) Extracto libre y encapsulado con proteínas de lentejas, (b) extracto libre y encapsulado con proteínas de quinua, (c) extracto libre y encapsulado con caseinato



de sodio, (d) extracto libre y encapsulado con proteínas de soja. FE: extracto libre, LP: proteínas de lentejas, QP: proteínas de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteínas de soja. *Las muestras marcadas con “*” no son significativamente diferentes en $p < 0,05$ 100

Figura 31. Efecto de las condiciones de almacenamiento en los extractos libres y encapsulados y su influencia sobre la actividad antimicrobiana contra *B. cereus* (○) y *S. aureus* (□). FE: extracto libre, LP: proteínas de lentejas, QP: proteínas de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteínas de soja, D0: cero días de almacenamiento, D12: doce días de almacenamiento, IC: concentración de inhibición. 103

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Las moléculas bioactivas presentes en las semillas de annatto (*Bixa orellana L.*) han sido altamente estudiadas, entre otros motivos, por sus propiedades antimicrobiana y antioxidante de gran interés para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Propiedades que han sido atribuidas principalmente a los compuestos polifenólicos y a la bixina como principal carotenoide. Al ser estos compuestos bioactivos más susceptibles a los procesos de degradación que sus homólogos sintéticos en las condiciones de procesamiento, almacenamiento y en los procesos de digestión; debido a los cambios de temperatura, exposición a la luz, de oxígeno y cambios de pHs, los bioactivos de fuentes naturales han sido cuestionados para su uso a nivel industrial. Para potencializar el uso de estos compuestos naturales, los procesos de encapsulación se presentan como una alternativa de protección de estos compuestos contra las circunstancias destructivas, mejorando su biodisponibilidad. En este sentido, la gelación iónica cobra importancia como mecanismos de encapsulación de activos debido que para la formación de hidrogeles no es necesaria la aplicación de altas temperaturas ni el uso de solventes, siendo el alginato de sodio el sistema más empleado como material de recubrimiento. Sin embargo, los hidrogeles basados en proteínas vegetales son especialmente acogidos por diferentes sectores debido a propiedades como: alto valor nutricional, excelentes propiedades funcionales, naturaleza anfifílica, biocompatibilidad, biodegradabilidad y menor toxicidad en comparación con los polímeros sintéticos. **OBJETIVO:** “evaluar las proteínas aisladas de fuentes vegetales (quinua, lentejas y frijol negro) como material de recubrimiento en la encapsulación del extracto de annatto por gelación iónica y estudiar el efecto de sus modificaciones estructurales en la capacidad encapsulante de las proteínas”. **METODOLOGÍA:** la obtención del extracto de semillas annatto fue optimizado y caracterizado por los métodos de extracción asistida por ultrasonido (UAE) y microondas (MAE) aplicando un diseño experimental (DOE) de superficies de respuestas para cada proceso con cuatro factores: pH del sistema de extracción (2-11), concentración de solvente (50-96%), relación semilla-solvente (1:2–1:10) y tiempo de tratamiento de ultrasonido (UAE: 0-30 min) o microondas (MAE: 0- 5 min). Las variables respuesta de cada proceso de obtención del extracto fueron: concentraciones de fenoles totales y bixina en el extracto. La actividad antimicrobiana, contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, y la actividad antioxidante fue determinada a los extractos obtenidos en los procesos optimizados. Por otro lado, la extracción de las proteínas vegetales de las semillas de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*), frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) y lentejas (*Lens culinaris*) fueron optimizadas utilizando un DOE para cada fuente con el fin de obtener el máximo rendimiento de extracción de las proteínas evaluando el efecto de los factores: pH (6-10), relación buffer : material vegetal (5:1 - 15:1) y tiempo de ultrasonido (0-20 min); adicionalmente, fue evaluado el efecto de este último factor sobre las propiedades funcionales de las proteínas: absorción de agua y aceite (WHC y FAC), temperatura de gelación (Tgel), rendimientos de extracción (EY), actividad y estabilidad emulsionante (EAI y ESI), cantidad de grupos SH (SH), punto isoeléctrico (PI) y peso molecular (MW) de las proteínas obtenidas. Una vez optimizados los procesos de extracción de las proteínas, se procedió a estandarizar el proceso de encapsulación por gelación iónica empleando las proteínas extraídas por la metodología optimizadas como material de recubrimiento, para lo cual se emplearon pruebas reológicas que determinaron las mejores condiciones que se adaptaran al mecanismo de encapsulación por gelación iónica. El tiempo de tratamiento térmico a 80°C (10-120 min), pH de la solución (8-11), concentración de

proteína (2.5-10.0%) y el cloruro de calcio (0-10%) se tomaron como variables para evaluar la capacidad de formación de cápsulas vacías por el procesos de encapsulación por gelación iónica. Posteriormente, los aislados proteicos que presentaron la capacidad de formación de cápsulas por gelación iónica fueron modificadas estructuralmente por hidrólisis enzimática (Alcalasa 2.4L por 15 y 60 min), N-acilación (cloruro de dodecanoilo) y N-cationización (cloruro de glicidiltrimetilamonio) para evaluar los efectos de las modificaciones en las propiedades funcionales de las proteínas y la eficiencia de encapsulación del extracto de annatto y un colorante como modelo de un sistema totalmente hidrofílico. Finalmente, una vez analizadas y definidas las proteínas que presenten la mayor eficiencia de encapsulación del extracto de annatto por el método de gelación iónica, estas capsulas fueron caracterizadas para el tamaño de partícula, espectroscopía de transmisión infrarroja, microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido. La estabilidad térmica en almacenamiento de las actividades antioxidantes y antimicrobianas, el contenido de los compuestos polifenólicos y el contenido de bixina del extracto libre y encapsulado se evaluaron durante 12 días a 4°C, 25°C y 65°C.

RESULTADOS: Las condiciones óptimas para la extracción de los compuestos bioactivos del extracto de semillas de annatto por UAE fueron: pH de 7.0, relación de semilla : solvente de 1:7 y tiempo de tratamiento de ultrasonido de 20min, obteniéndose un extracto con 0.62% de bixina, 3.81mg ácido gálico/mg equivalente de compuestos polifenólicos, capacidad antioxidante por ABTS, FRAP y DPPH de 1035.7, 424.7 y 1161.5 $\mu\text{M}_{\text{trolox}}/\text{L}$, respectivamente y una concentración mínima inhibitoria contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* de 32 y 16 mg/L, respectivamente. Para el caso de MAE, se obtuvieron los siguientes resultados: 0.57% de Bix, 4.36mgAG/mg semilla para Ft, ABTS 577,68 $\mu\text{MTrolox}/\text{L}$, FRAP 316,37 $\mu\text{MTrolox}/\text{L}$, DPPH 1043,90 $\mu\text{MTrolox}/\text{L}$ y CMI's contra *B. cereus* y *S. aureus* de 16 y 8ppm, respectivamente. Los resultados demostraron que no hay diferencias estadísticas entre los métodos UAE y MAE ($p > 0,05$), pero si hay diferencias con la extracción por lixiviación, demostrando que las UAE y MAE son más eficientes debido a que requieren menos tiempo de extracción para obtener los compuestos polifenólicos y la bixina de las semillas de annatto. Consecuentemente, la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos obtenidos por ambas tecnologías emergentes fueron mayores que los reportados por los extractos obtenidos por lixiviación, lo que demuestra que ambos métodos no afectan las propiedades bioactivas del extracto. Por otro lado, los niveles de los factores que maximizaron el rendimiento de extracción de las proteínas de la quinua y de frijol negro fueron: pH de 9, relación buffer-material vegetal de 5:1 y tiempo de ultrasonido de 20min, mientras que, para la lenteja fue necesaria una relación de buffer-material vegetal 1:10 al mismo pH y tiempo de ultrasonido optimizado para las otras fuentes. La aplicación de ultrasonido generó un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para propiedades funcionales relacionadas con la estructura secundaria de las proteínas como Tgel, EAI, WHC y FAC; sin embargo, la aplicación de ultrasonido en el procesos de extracción no género un efecto estadísticamente significativo ($p > 0,05$) para las propiedades de las proteínas relacionadas a su estructura primaria. El análisis de componentes principales (PCA) mostró tres grupos independientes, el primero relaciona SH con Tgel, el segundo relaciona el tratamiento de extracción con EY y el último MW con EAI y FAC. Los resultados de la evaluación de los factores que influyen en el proceso de encapsulación por gelación iónica demostraron que la incorporación de Ca^{2+} , el aumento en la concentración de proteína y la disminución del pH aumentaron el comportamiento elástico de las soluciones, independientemente de la fuente de proteína. Sin embargo, el tratamiento térmico y la concentración de la proteína en la solución causaron el mayor impacto en el

comportamiento reológico de las proteínas y formación de geles, independientemente de la fuente, el pH o los iones Ca^{2+} . A pesar de que las proteínas aisladas de frijón negro presentaron la capacidad de formación de gel por tratamiento térmico en las pruebas reológicas, estas no presentaron la capacidad de formación de cápsulas por gelación iónica empleando la metodología estandarizada. La modificación de las proteínas vegetales por los métodos de hidrólisis enzimática, N-acilación y N-cationización favorecieron las propiedades funcionales de las proteínas como la solubilidad, la capacidad de adsorción de agua y de aceite, y la capacidad de formación y estabilidad de emulsiones. Sin embargo, la hidrólisis enzimática de las proteínas no favoreció la formación de geles y tampoco la capacidad de formación de cápsulas. Por su parte, las modificaciones estructurales generadas en las proteínas por N-acilación y N-cationización incrementaron la eficiencia de encapsulación tanto de compuestos hidrosolubles (colorante artificial) como del extracto de annatto en comparación con las obtenidas en las proteínas nativas, sin embargo, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Por tal motivo, las proteínas de quinua y lentejas en su estado nativo fueron usadas para la evaluación de la estabilidad de los compuestos bioactivos del extracto de annatto encapsulado por gelación iónica. Finalmente, los resultados demostraron la capacidad de las proteínas nativas para encapsular el extracto de annatto con eficiencias de encapsulación que van del 58% al 80%, donde la estructura de la proteína y el contenido de aminoácidos fueron los factores relevantes para obtener una alta eficiencia de encapsulación. Los extractos libres almacenados a 65°C durante 12 días experimentaron una degradación de ~ 59.95% y ~ 44.33% de bixina y compuestos polifenólicos, respectivamente. Por el contrario, los extractos encapsulados con las proteínas vegetales nativas reportaron degradaciones entre el ~ 34.00% a ~ 4.05% para compuestos polifenólicos y de ~ 20.0% para la bixina. **CONCLUSIÓN:** Las proteínas vegetales extraídas de las fuentes de quinua y lentejas en su estado nativo presentaron una capacidad potencial de encapsulación del extracto de annatto por gelificación iónica cumpliendo su función de protección y estabilización de los compuestos bioactivos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Extracto de semillas de annatto (*Bixa orellana* L.).

Las semillas provenientes de la especie vegetal *Bixa orellana* L. (achiote, urucum o annatto) son ampliamente empleadas en la industria alimentaria como fuente de colorante natural debido a su alto poder colorante; entre sus aplicaciones se resalta el uso del colorante en alimentos como la mantequilla, derivados lácteos, en la panificación y en la confitería (1,2). A nivel mundial, se estima que la producción anual de semillas de annatto es aproximadamente de 14.500 toneladas (peso seco), de los cuales cerca del 40% es producido entre África y Asia, y el 60% restante está centrado en países de América latina, siendo Brasil, Perú y México los mayores productores (3). Según los reportes expedidos por Agronet 2020 [4], basados en los datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en el 2008 Colombia produjo un promedio de 100 toneladas de semillas de annatto mientras que para el 2018 se reportó una producción de 880 toneladas de semillas. Los departamentos productores fueron: Chocó con una participación del 94.19 % y La Guajira con el 5.81 %. Esta producción fue destinada, en su gran mayoría, para la obtención del colorante natural. El pigmento obtenido de las semillas de annatto es rico en compuestos bioactivos como carotenoides (bixina y nor-bixina) y compuestos polifenólicos (catequina, ácido clorogénico, crisina, buteína, hipolaetina,

licochalcona A y xantoangelol) (Figura 1), los cuales le atribuyen al extracto no solo la capacidad colorante anteriormente mencionada, si no también, actividades biológicas tales como la actividad antioxidante y antimicrobiana; las cuales son de alto interés tanto para la industria alimentaria como para las industrias farmacéutica y cosmética (4).

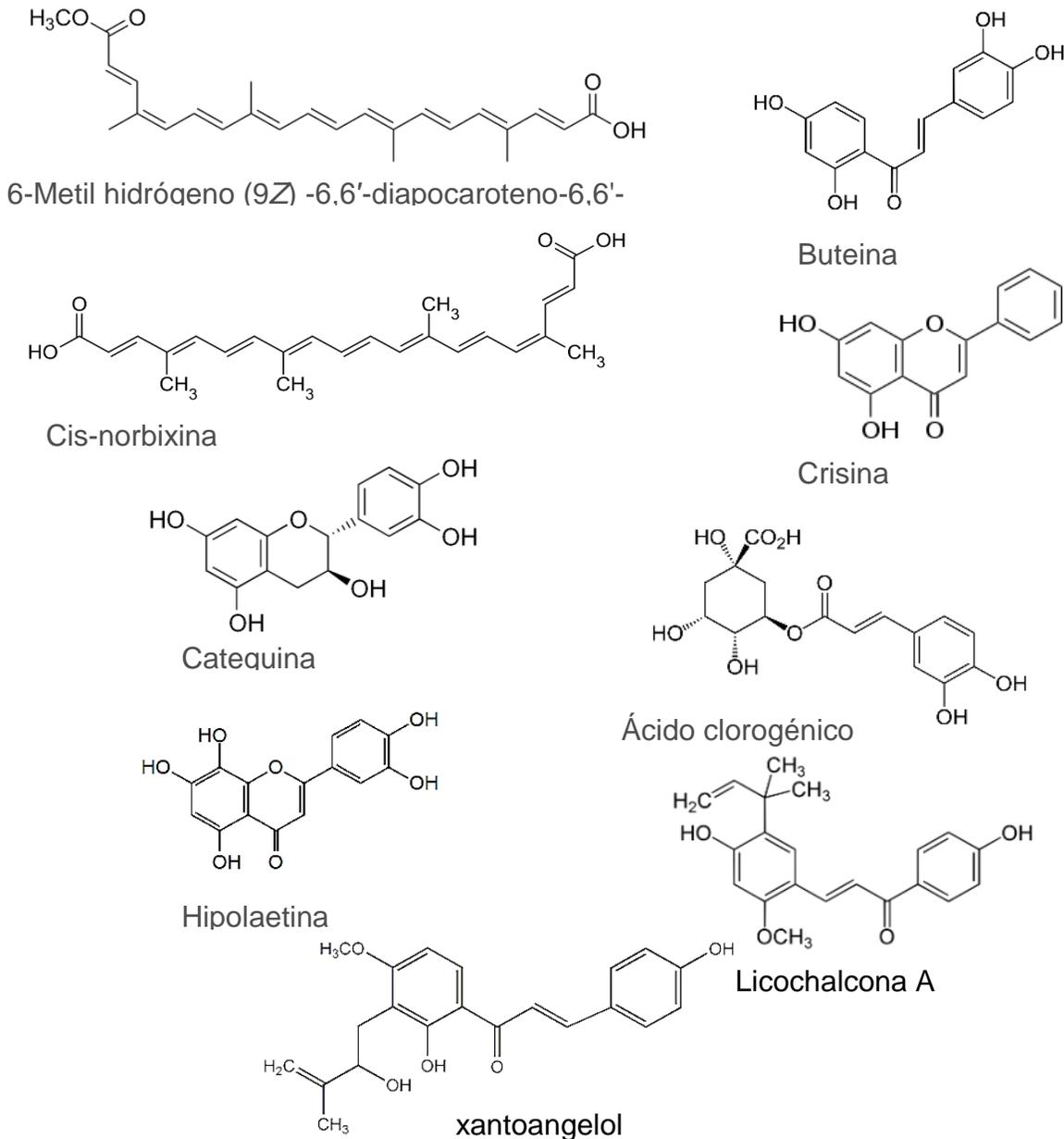


Figura 1. Principales compuestos bioactivos presentes en el extracto de semillas de annatto (4).

La actividad antioxidante del extracto es atribuida a la alta conjugación de sus compuestos bioactivos (Figura 1), la cual le permite a los compuestos carotenoides y polifenólicos

desactivar radicales libres formados en una matriz; como el oxígeno singlete asociado generalmente con la fotosensibilización. Mientras que la actividad antimicrobiana se debe principalmente a la capacidad de estos compuestos bioactivos de desnaturalizar las proteínas de la membrana celular de los microorganismos provocando lisis celular (2,5,6).

Diversos reportes científicos han demostrado las actividades biológicas del extracto obtenido por lixiviación; Zhang et al. evaluaron la capacidad de la bixina para promover la transcripción de un nuevo factor relacionado con Ets (Nrf2) y E74 como factor 2 (ELF2) en un modelo murino que presentaban inflamación en su tejido pulmonar inducido con partículas de SiO₂. Estos factores de transcripción regulan la expresión inducible de numerosos genes de enzimas desintoxicantes y antioxidantes mediante la unión a una secuencia de ADN específica conocida como el elemento de respuesta antioxidante, lo que favorece la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación (7,8). La conclusión principal de este estudio fue que la inhalación de partículas del extracto de annatto disminuyó el estrés oxidativo, lo cual a su vez disminuyó la inflamación y las lesiones del tejido pulmonar inducida por la exposición a las partículas en el modelo murino (7).

Por otro lado, Viuda et al. evaluaron la actividad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* del extracto de semilla de annatto. Al extracto obtenido por lixiviación lo sometieron a cinco pruebas de actividad antioxidante diferentes entre donación de hidrógeno o de eliminación de radicales, que incluyen el radical estable 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), el poder antioxidante reductor férrico (FRAP), la sustancia reactiva de ácido tiobarbitúrico (TBARS), Rancimat y la actividad quelante de iones ferrosos (Fe²⁺). Por otro lado, el método de microdilución en caldo se utilizó para evaluar la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* (CECT 910), *Aeromonas hydrophila* (CECT 5734), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Los investigadores reportaron que el extracto de semilla de achiote se puede emplear como un conservante natural alternativo para reemplazar los aditivos sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) en las matrices alimentarias debido a su extensa actividad antioxidante (93,01 ± 1,22, 75,88 ± 0,21, 25,41 ± 3,52, 10,53 ± 0,31 y 1,34 ± 0,07 para DPPH (inhibición, %), TBARS (inhibición, %), FRAP (TEAC), FIC (efecto quelante, %) y rancimat (AAI), respectivamente). Además, el extracto presentó una acción antimicrobiana comparable con algunos antimicrobianos sintéticos (1024 mg/mL, 256mg/mL, 512mg/mL y 256mg/mL para *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *L. innocua* y *A. hydrophila*, respectivamente) (2).

Otros estudios han reportado la capacidad antioxidante del extracto de semillas de annatto en matrices alimentarias. El estudio realizado por Martin et al. en 2014 (9) incorporaron el extracto de annatto en un paté de hígado de cerdo, evaluando el contenido de polifenoles totales y estabilidad oxidativa por la metodología de rancimat. En la investigación determinaron que el paté con el extracto de annatto tenían mayor índice de actividad antioxidante que los controles, pero este índice de actividad antioxidante y el contenido de compuestos polifenólicos disminuyeron con el tiempo de almacenamiento, partiendo desde 1,77 ± 0,04 % índice de actividad antioxidante en el día cero hasta 0,76 ± 0,04 en el día 21 de almacenamiento (9). Los autores concluyeron que el extracto de semillas de annatto es un potencial aditivo para ser empleado en la industria no solo por su poder colorante sino también por su actividad antioxidante y a su actividad antimicrobiana reportada; sin embargo, su baja estabilidad a

condiciones extremas de luz y temperatura conllevan a la búsqueda de estrategias para mejorar esta condición (9,10).

No solo las condiciones como la temperatura y la luz son factores importantes para la conservación u obtención de las actividades biológicas del extracto de semillas de annatto. El método obtención del extracto es un factor que afecta los compuestos bioactivos del extracto final, dentro de los principales métodos se encuentran: la maceración, lixiviación, extracción líquido-líquido, extracción enzimática, microextracción y extracciones emergentes como la extracción con fluidos supercríticos (CO₂), extracción asistida por ultrasonido (UAE) y microondas (MAE) (11). Particularmente, se han empleado métodos mecánicos, lixiviación, MAE, UAE y CO₂ para la obtención del extracto de las semillas de achiote (11–14). No obstante, estos estudios se han centrado exclusivamente en la extracción del pigmento, dejando de lado la evaluación del efecto del tratamiento de extracción en las actividades antimicrobiana y antioxidante. El aumento del rendimiento de extracción de los compuestos bioactivos obtenidos por UAE y MAE se atribuye a la aceleración de la transferencia de masa de la fase sólida a la fase líquida (11).

La extracción asistida por microondas (MAE) implica la formación de ondas electromagnéticas de alta energía que tienen una frecuencia, un período de oscilación y una longitud de onda que varía entre 300 MHz-30 GHz, 3×10^{-9} s - 33×10^{-12} s y 1-10 mm, respectivamente. Estas ondas tienen la capacidad de cambiar la rotación molecular y la movilidad iónica del medio sin alterar la muestra. Esta rotación genera la adsorción y disipación de energía en el medio, provocando un calentamiento generalizado, forzando la migración rápida de todos los compuestos activos de la fase sólida a la fase solvente (11,15–19).

Por otro lado, la extracción asistida por ultrasonido (UAE) crea la cavitación de pequeñas burbujas en el solvente debido al paso de ondas de ultrasonido generando micro-dominios de alta presión, alta temperatura y formación de micro-chorros, favoreciendo así una mayor penetración del solvente dentro del material aumentando el área de intercambio másico y disminuyendo los tiempos de extracción (15,19).

2.2. Encapsulación de compuestos bioactivos.

Al igual que la mayoría de los extractos naturales, las sustancias bioactivas presentes en el extracto de semillas de annatto se ven afectadas por factores como la luz, la temperatura, el oxígeno y pHs extremos. Tales condiciones se deben tener en cuenta en los procesos de producción y almacenamiento de productos, para disminuir o evitar las reacciones de degradación química que llevan al extracto a perder su actividad biológica (20).

Las principales alteraciones sufridas por los carotenoides altamente insaturados son la isomerización geométrica sufrida por el calentamiento y la oxidación, comenzando por epoxidación, hidroxilación y fragmentación de las moléculas; como consecuencia de estas fragmentaciones se obtienen compuestos volátiles de bajo peso molecular, disminuyendo así su actividad biológica, su concentración y su poder colorante (21).

Por otra parte, la estructura de los polifenoles está comprendida por uno o más anillos de benceno con al menos dos grupos hidroxilo, que son altamente reactivos y son los responsables de su capacidad antioxidante; sin embargo, estos también pueden desencadenar reacciones de deterioro como la auto-oxidación en condiciones ambientales

específicas, en la cual los grupos hidroxilo de los polifenoles en presencia de oxígeno pueden formar peróxidos e hidroperóxidos (21). Otras de las reacciones de degradación de los polifenoles en la que se involucran los grupos hidroxilo son la esterificación, alquilación, carboximetilación y quelación; todas estas modificaciones se traducen en una disminución de la concentración y de la bioactividad de los compuestos polifenólicos (21).

Los procesos de encapsulación, microencapsulación o nanoencapsulación son un conjunto de técnicas que permiten atrapar ingredientes activos utilizando un material circundante o de recubrimiento, es decir, como material de encapsulación o envoltura. Este proceso apunta a crear una barrera física para proteger el ingrediente activo del ambiente externo, permitiendo una posible liberación controlada de este, mejorar su estabilidad y aumentar la eficacia de los compuestos encapsulados (22). Por lo general, las micro y nano tecnologías son técnicamente similares, ajustando algunas condiciones operativas para obtener micropartículas o nanopartículas (23).

Gran parte de los desafíos en los procesos encapsulación de compuestos activos son los mismos para las industrias farmacéutica y alimentaria, centrándose en tres áreas: las fuentes y propiedades de los materiales de recubrimiento, los parámetros de formulación en los procesos de encapsulación y las condiciones de operación a gran escala (23). El material de recubrimiento es un factor determinante en la eficiencia de encapsulación, la estabilidad de los encapsulados obtenidos y los sistemas de liberación del activo (24). Los polisacáridos, como la goma arábica, la maltodextrina con diferentes equivalentes de dextrosa y algunas proteínas, con frecuencia son empleados como materiales de encapsulación, debido a que estos presentan características como capacidad emulsionante, capacidad de formación de película y baja viscosidad a altas temperaturas (24). Entre las principales técnicas de encapsulación está el secado por aspersión, la coacervación, la liofilización, los liposomas, la formación de emulsiones y la formación de hidrogeles mediante gelación iónica; siendo este último, un proceso desarrollado principalmente para inmovilizar células bacterianas, debido a que no requiere el uso de elevadas temperaturas, ni de solventes orgánicos, razón por la cual es de gran utilidad durante el desarrollo de ingredientes alimentarios naturales y termolábiles (22,25).

En el caso de la encapsulación del extracto de annatto se han reportado procesos de encapsulación empleando quitosano (26), goma arábica (27), maltodextrina (28) y caseinato de sodio (29) como materiales de recubrimiento, principalmente en procesos de encapsulación como el secado por aspersión y/o liofilización. Todos estos procesos de encapsulación han reportado la reducción en la cinética de degradación térmica de la bixina, así como de su fotodegradación en dispersiones acuosas. Sin embargo, la aplicación de técnicas de encapsulación como el secado por aspersión implican el uso de altas temperaturas, equipos especializados y alto gasto energético, lo que desfavorece la estabilidad de los compuestos activos durante el procesamiento e incrementa los gastos (27). De igual forma, las encapsulaciones de compuestos activos por el proceso de liofilización implican altos gastos energéticos provenientes del proceso de enfriamiento y de variación de presión que este conlleva, además son procesos de encapsulación que no alcanzan a reportar altos porcentajes de eficiencia de encapsulación (27). Por su parte, el material de recubrimiento juega un gran papel en el éxito del proceso de encapsulación acorde al objetivo para el cual fue aplicada la técnica. Materiales de recubrimiento como la maltodextrina y goma arábica, son materiales de recubrimiento que cumplen exitosamente la función de proteger los compuestos bioactivos de

las condiciones medioambientales. Sin embargo, cuando se plantea un proceso de encapsulación para no solo brindarle estabilidad a los compuestos bioactivos, sino además incrementar su biodisponibilidad de los mismo, los materiales de recubrimiento como la maltodextrina y la goma arábigo no son muy efectivos, debido a que estos son altamente solubles a un alto rango de pH, lo que genera poca especificidad de liberación y cinéticas de liberación con velocidades altas (22).

2.2.1. Encapsulación de compuestos activos por gelación iónica.

Los hidrogeles pueden ser usados para encapsular compuestos bioactivos debido a su bio-similitud, interior acuoso y estructura porosa, estos han sido empleados para encapsular extractos obtenidos de diferentes fuentes naturales como el extracto de uva (30), arándanos (31), yerba mate (32), hojas de stevia (33), entre otros.

El proceso de obtención de los hidrogeles consiste en la interacción entre dos polímeros o la auto-asociación entre un polímero y un ion multivalente con cargas opuestas (34). La interacción entre dos polímeros o la auto-asociación para la formación de los hidrogeles está asociada a la técnica en encapsulación por coacervación, la cual busca desestabilizar un sistema equilibrado entre uno o más materiales de recubrimiento y el activo a encapsular, produciendo una reacción en cadena que genera la precipitación o floculación del material de recubrimiento y en su interior el compuesto activo ya encapsulado. Entre los procedimientos inductores de la coacervación se reportan los cambios de temperatura, modificación del pH y adición de un anti-solvente, una sal o un polímero incompatible (35,36).

Por otro lado, La gelación iónica aprovecha la composición química del material de recubrimiento para encapsular compuestos activos en geles. La reacción entre los grupos activos del material de recubrimiento y un ion multivalente con carga opuesta, produce un reordenamiento estructural o reticulación del material de recubrimiento, obteniendo un sistema coloidal donde la fase continua es sólida (material de recubrimiento) y la fase dispersa es líquida, dando como resultado la formación de las cápsulas (37,38).

Esta técnica de encapsulación tiene la ventaja de ser una técnica simple, eficiente y de bajo costo que no requiere equipo especializado, asimismo emplea condiciones suaves, ya que no emplea altas temperaturas, agitación vigorosa o solventes orgánicos, lo que permite la encapsulación de sustancias que se degradarían bajo estas condiciones (22). Además, esta técnica permite la encapsulación de compuestos tanto hidrófobos como hidrófilos, sin embargo, una desventaja de estas es que la encapsulación de materiales hidrofílicos o de bajo peso molecular han reportado problemas de fácil difusión y liberación rápida a través de la red de gel iónico independientemente del pH, lo cual ha conllevado a la búsqueda de nuevos materiales de recubrimiento que tengan la capacidad de formar los hidrogeles y dar mayor control en los procesos de liberación de los compuestos activos encapsulados (39).

Los materiales de recubrimiento principalmente empleados en los procesos de encapsulación por gelación iónica son los biopolímeros, dentro de este grupo se destacan el alginato de sodio (37). Los alginatos son copolímeros lineales aniónicos compuestos de β -D ácido manurónico (M), y α -L ácido gulurónico (G) unidos por enlaces β 1-4 (Figura 2) y es estructurado por bloques que pueden ser homopoliméricos (M o G) o heteropoliméricos (MG) (37). Ambas unidades monoméricas presentan en su estructura grupos carboxilos ionizados (COO^-), una vez se disocia el sodio en la estructura estable del biopolímero, este grupo activo le permite al alginato iniciar un proceso de reticulación cuando está en contacto con un ion

multivalente; usualmente el ion Ca^{2+} , formando cavidades cargadas negativamente en las que se sitúan los cationes (estructura de caja de huevos), la cual finalmente va a generar los agregados capsulares.

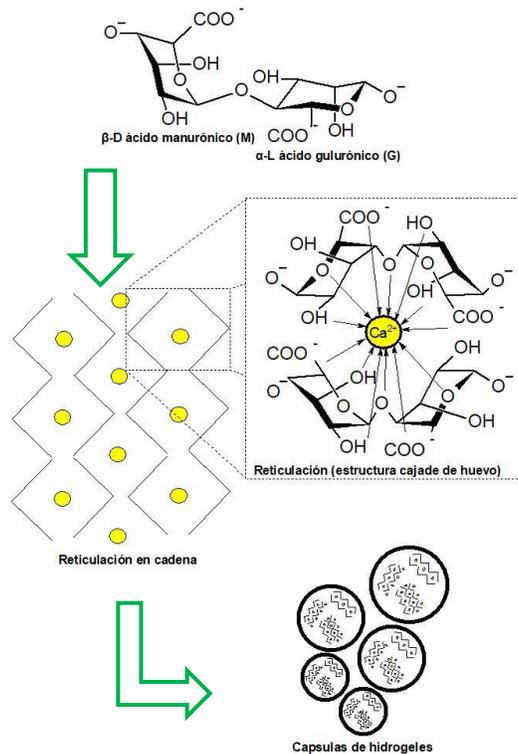


Figura 2. Proceso de formación de hidrogeles entre el alginato de sodio y el ion polivalente Ca^{2+} por gelación iónica.

El proceso de formación de microcapsulas por gelación iónica se realiza por extrusión, de la cual se reportan dos mecanismos, la gelación iónica externa y gelación iónica interna. La gelación iónica externa consiste en dejar caer una solución o dispersión del material de recubrimiento junto con el principio activo sobre una solución concentrada con iones divalentes, sales de calcio (CaCl_2) principalmente. Mientras que la gelación iónica interna, consiste en la extrusión de una dispersión compuesta del material de recubrimiento, principio activo y sal de calcio insoluble (CaCO_3) sobre un medio compuesto por aceite acidificado. La reacción comienza cuando los iones calcio Ca^{2+} se solubilizan en el medio acidificado, los cuales posteriormente generan interacciones iónicas con el material de recubrimiento, formando agregados, encapsulando así el principio activo (40).

2.3. Proteínas como materiales de recubrimiento.

El estudio de las proteínas como materiales de recubrimiento en los procesos de encapsulación ha incrementado significativamente en los recientes años. En los productos encapsulados, las proteínas funcionan como materiales de recubrimiento y fuente de aminoácidos, simultáneamente (41). Además de la contribución nutricional, las proteínas tienen varias propiedades funcionales tales como las capacidades de estabilizar sistemas coloidales, de modificar las propiedades reológicas del medio, de retener agua y aceite en el

sistema y de formar geles y espumas (42). Las propiedades funcionales de las proteínas son atribuidas principalmente a la estructura que adquiere de acuerdo a su fórmula molecular, que a su vez, es una estructura flexible y cambiante dependiente de las condiciones del medio, la presencia de micro-dominios hidrofóbicos e hidrofílicos distribuidos a través de su estructura (propiedad anfifílica) y la carga neta de la proteína (42).

La mayor parte de las investigaciones se han centrado en estudiar la capacidad encapsulante de las proteínas animales, principalmente, los aislados proteicos del lactosuero (43), gelatina (44) y caseína (43). Estas proteínas animales se han empleado como material de recubrimiento para encapsular: vitamina D (44,45), compuestos bioactivos del sauco (46), microorganismos (47), aceite de girasol (43), aceite de oliva (43), aceite esencial de naranja (48), entre otros compuestos; con la finalidad de mejorar la estabilidad de estos sistemas. También se han utilizado complejos de proteínas animales y carbohidratos para encapsular extractos naturales y aceites esenciales, con el objetivo de mejorar propiedades de liberación del activo, tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación o propiedades mecánicas de las cápsulas. Dentro de los complejos más estudiados se encuentran: gelatina/goma arábica, gelatina/pectina, lacto suero/maltodextrina, trehalosa/lactosuero o caseinato de sodio y lactosa/caseinato de sodio (43,49).

A pesar de los avances en los procesos de encapsulación empleando proteínas animales, los estudios de proteínas de fuentes vegetales como materiales de recubrimiento se han incrementado significativamente en los últimos años (Tabla 1), esto generalmente debido a que las fuentes de las proteínas son menos costosas, estas pueden reducir el riesgo de propagación de enfermedades como la encefalitis espongiforme bovina (enfermedad de las vacas locas) y son aceptables para una tendencia creciente del consumidor hacia fuentes de productos vegetarianos (43).

Por lo tanto, varios estudios se han centrado en el aislamiento y caracterización de proteínas de fuentes vegetales como: quinua, guisantes, soja, arroz, girasoles y semillas de calabaza. Como resultado, se ha reportado una actividad emulsionante adecuada y estabilidad mejorada, capacidad de formación de gel y eficacia en proteger diversos compuestos activos en procesos de encapsulación (50–54). Las proteínas aisladas de soja se han estudiado con mayor frecuencia que otras proteínas de fuentes vegetales, posiblemente debido a su amplia disponibilidad comercial (43). No obstante, aislados proteicos de lentejas, semillas de girasol, guisantes y frijoles se han empleado como materiales de recubrimiento de vitaminas, aceites con actividad antioxidante y extractos de plantas (43,50,53–55). Varios reportes han indicado que, en comparación con proteínas animales como el caseinato de sodio o las proteínas de lactosuero, los productos encapsulados con proteínas vegetales como material de recubrimiento exhiben una eficiencia de encapsulación comparable o incluso mejor, ofreciendo una mayor estabilidad contra la oxidación de los compuestos bioactivos (43).

Tabla 1. Estudios reportados de encapsulación de activos usando proteínas vegetales como materiales de recubrimiento.

Material de recubrimiento	Compuesto activo	Técnica de encapsulación	Referencia
Alginato/ proteínas de lupino	Aceite de linaza	Gelificación iónica	(56)
Proteína de soya	Aceite de linaza	Secado por aspersión / liofilización	(57)
Proteínas de soya/ semillas de girasol	α -tocoferol	Secado por aspersión	(54)
Proteína de soya / pectina	Propóleos	Coacervación compleja	(58)
Proteínas de soya/ lentejas	Aceite de canola	Secado por aspersión	(59)
Proteínas de guisantes	Ácido linoleico	Secado por aspersión	(60)
Proteínas de guisantes	Planchar	Secado por aspersión	(61)
Proteínas de soya y de suero lácteo	Aceite de pescado	Gelación	(62)
Proteínas de lentejas y garbanzos	Aceite de linaza	liofilización	(63)
Proteínas de lentejas y garbanzos	Aceite de linaza	Secado por aspersión	(64)
Zeina	Aceite de oliva	Evaporación de solvente	(65)
Proteína de soya	Pepperonioloesina	Secado por aspersión	(66)
Proteína de soya	Aceite de naranja	Secado por aspersión	(67)
Proteínas de soya y de suero lácteo	Aceite de naranja y sabores	Secado por aspersión	(51)
Proteína de soya	Acido ascórbico / α -tocoferol / vitaminas	Secado por aspersión	(68)
Proteína de soya	Caseína hidrolizado	Secado por aspersión	(69)
Proteína de soya	Oleorresina de pimentón	Secado por aspersión	(66)
Proteína de soya /gelatina	Caseinhidrolizado	Secado por aspersión	(70)
Proteína de soya	Aceite de pescado	Coacervación simple	(71)
Proteína de soya / goma arábica	Aceite de naranja	Coacervación compleja	(52)
Proteína de linaza / goma de linaza	Aceite de linaza	Secado por aspersión, liofilización y coacervación	(72)

El secado por aspersión (73), la liofilización (74) y la coacervación (30) son los principales procesos de encapsulación en los cuales se han utilizado las proteínas vegetales y animales como materiales de recubrimiento. Para los dos primeros procesos de encapsulación se requiere la formación previa de una emulsión estable donde las proteínas actúen como tensoactivos debido a su naturaleza anfifílica. Las proteínas se depositan en la interfaz (aceite/agua) del sistema coloidal y orientan su micro-dominio hidrófilos o hidrófobos a la fase acuosa y oleosa del sistema, respectivamente. Como resultado, se genera una película viscoelástica alrededor del compuesto bioactivo, gracias a las fuerzas electrostáticas y estéricas que impiden la separación de fase (52). Una vez que se obtiene una emulsión estable, esta se somete a un proceso de secado, ya sea por aspersión o por liofilización, obteniendo así los encapsulados. En cambio, para encapsular el compuesto bioactivo por coacervación se debe realizar una desestabilización del sistema, cambiando el pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas, produciendo un agregado proteico que resulta en la encapsulación de los compuestos bioactivos (75).

La propiedad gelificante de las proteínas se establece en su capacidad para formar redes tridimensionales, y esto depende del cambio de estructura terciaria de las proteínas, ya sea por una desnaturalización parcial causada por tratamientos térmicos, o un cambio en su estructura por la rotura de enlaces peptídicos (76). Esta modificación estructural permite la formación de nuevas interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y enlaces de disulfuro entre las subunidades de la proteína. La presencia de los iones Ca^{2+}

durante la formación de los geles proteicos aumenta las interacciones iónicas coordinadas entre los grupos ionizados presentes en la estructura de la proteína, principalmente los grupos carboxilos presentes en los ácidos aspártico y glutámico, fortaleciendo así la estructura del gel (76). Estos aminoácidos (ácido aspártico y glutámico) son los compuestos encontrados principalmente en proteínas de origen vegetal (54), convirtiéndolas así en potenciales materiales de recubrimiento en procesos de encapsulación por gelación iónica. En un estudio *in vitro* se empleó una mezcla de proteína de soja y alginato de sodio como materiales de recubrimiento para encapsular el aceite esencial de tomillo por gelación iónica (77). Estos autores reportaron que la proteína de soja aumentó la eficiencia de encapsulación de 76% a 80% basado en compuestos de polifenoles totales, y disminuyó el tamaño de partícula de $1312 \pm 32 \mu\text{m}$ a $1256 \pm 51 \mu\text{m}$. Estos cambios se atribuyeron a los grupos radicales de la proteína de soja expuestos que generaron una estructura similar a una red con iones Ca^{2+} (Figura 2) (77).

Los encapsulados de compuestos bioactivos como los carotenoides, en los que se emplean las proteínas como materiales de recubrimiento, han reportado una mayor estabilidad de almacenamiento que los encapsulados con carbohidratos como el almidón, esto debido a la alta unión de las proteínas que se ve respaldada por la mayor protección contra el daño oxidativo del activo (27). Otros estudios realizados con proteínas globulares mostraron que las proteínas de soja y suero de leche son agentes de encapsulación eficientes para proteger y modular la liberación de una amplia variedad de nutraceuticos y compuestos bioactivos [9]. Estos y otros resultados han motivado la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas con potencial capacidad gelificante, así como la capacidad de funcionar como agentes encapsuladores de diversos compuestos bioactivos a través de sistemas de hidrogel, y su posterior evaluación de los mecanismos de liberación *in vitro* en los sistemas digestivos (41).

En consecuencia, fuentes vegetales como la quinua (*Chenopodium quinoa*), las lentejas (*Lens culinaris*) y el frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) se han reportado como fuentes ricas en proteína. La quinua es un pseudocereal cultivado principalmente en los Andes de América del Sur, contiene entre 12% y 20% de proteína. Las proteínas aisladas de quinua son principalmente del tipo globulinas y albúminas con un coeficiente de sedimentación (s) de tipo 11S y 2s de 37% y 35%, respectivamente (pesos moleculares entre 8- 39 kDa). Además, se resalta que su composición contiene aminoácidos esenciales, como la lisina, que está ausente en otras proteínas de granos y trigo (78). Las lentejas son leguminosas con un contenido proteico entre el 24 y el 30% dependiendo del genotipo y las condiciones de cultivo (79). Estas proteínas, al igual que la mayoría de las proteínas de fuentes vegetales, se componen de proteínas tipo globulinas y albúminas, con un peso molecular entre 14 y 66 kDa. Algunos estudios informan que las proteínas aisladas de las lentejas tienen una alta capacidad emulsificante y capacidad de retención de agua y aceite, por lo que las convierte en buenos materiales de recubrimiento en los procesos de encapsulación (80,81). Por otro lado, el frijol negro es una fuente vegetal con un contenido proteico que oscila entre el 20 y el 30% p/p y donde sus proteínas exhiben un bajo contenido de aminoácidos de tipo azufre. Las globulinas tipo 7, 11 y 12 S extraídas de frijol negro tienen un peso molecular que oscila entre 22 y 186 kDa. Estas globulinas se han utilizado para la estabilización de emulsiones y como agentes espumantes (82).

2.4. Modificaciones estructurales de proteínas vegetales.

La aplicación de proteínas de fuentes vegetales en los procesos de encapsulación de compuestos activos sigue siendo muy limitada en el campo de la investigación, debido principalmente a su baja solubilidad en agua y a que se requiere una alta concentración de las mismas para generar un cambio en las propiedades viscoelásticas de las dispersiones. Motivo por el cual, en varias investigaciones se ha planteado como estrategia la modificación estructural de las proteínas de fuentes vegetales, con el fin de generar cambios en sus propiedades funcionales, que permitan incrementar su solubilidad en agua y su capacidad emulsificante; propiedades que permitirán aumentar el potencial uso de estas proteínas modificadas como materiales de recubrimiento en los procesos de encapsulación de compuestos activos (68,83–86). Entre las investigaciones más resaltantes esta la realizada por Nesterenk et al. (2012), quienes evaluaron el efecto producido por la hidrólisis enzimática, el tratamiento de N-acilación y N-cationización de las proteínas aisladas de soya, sobre sus propiedades funcionales, específicamente sobre su capacidad de encapsulación del β -caroteno, utilizando el método de secado por aspersión (87). Como conclusión se encontró que los cambios estructurales producidos por las tres metodologías, principalmente de la N-acilación, permitieron disminuir el tamaño de la gota y la modificación de las propiedades viscoelásticas de las emulsiones producidas durante el proceso de encapsulación, y como resultado se obtuvo un incremento en la eficiencia de encapsulación del activo.

2.4.1. Hidrólisis enzimática de proteínas vegetales.

La hidrólisis enzimática de las proteínas ha sido ampliamente estudiada y aplicada a muchas proteínas vegetales, tales como proteínas de trigo, avena, guisantes y arroz (55,68,85,88–90). La hidrólisis enzimática se realiza con endo y exopeptidasas, estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, es decir, producen la ruptura de enlaces por agua siguiendo la siguiente reacción: $H-OH + R-R' \rightarrow R-H + R'-OH$. Las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos localizados dentro de las cadenas de las proteínas, estas a su vez se dividen en dos grupos: aminopeptidasas si actúan sobre el final de la cadena polipeptídica por el grupo amino terminal, y carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo en el que se encuentra el grupo carboxilo. Por el contrario, las exopeptidasas rompen los aminoácidos terminales. Por lo tanto, para obtener fragmentos de proteínas más pequeñas y para mejorar sus propiedades fisicoquímicas, es recomendable utilizar endopeptidasas (55,84,91).

Los hidrolizados de proteínas de origen vegetal se utilizan como ingredientes activos o aditivos de productos funcionales en cosméticos, alimentos y medicamentos. Las propiedades funcionales de los hidrolizados dependen de factores como el peso molecular, estructura y secuencia de aminoácidos. El parámetro básico para caracterizar el nivel de hidrólisis y las propiedades de los hidrolizados es el grado de hidrólisis (GH), el cual se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en toda la molécula (55,84,91).

Adler-Nissen y Olsen (55) observaron que las propiedades emulsionantes y de formación de espuma de la proteína de soya se pueden mejorar por hidrólisis enzimática hasta un GH limitado (hasta 10%), de hecho, los péptidos obtenidos deben tener un tamaño suficiente para formar una película estable alrededor de las gotas de la fase dispersa (55).

2.4.2. N-acilación de proteínas.

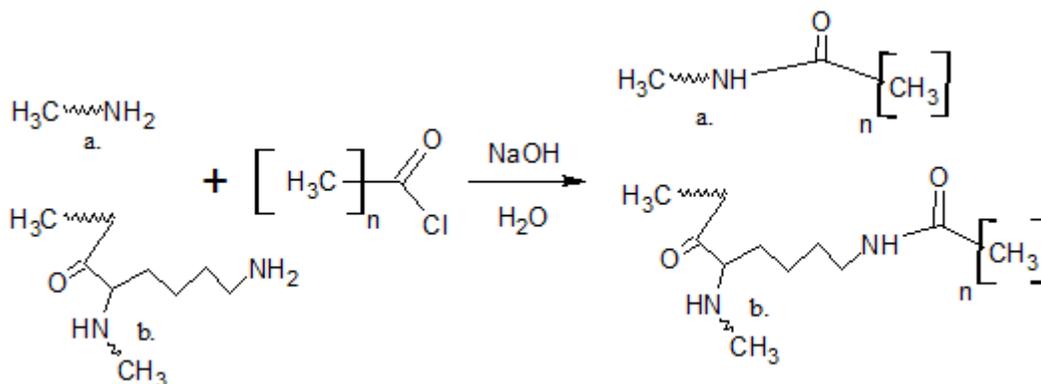
La reacción de N-acilación se realiza para unir covalentemente una cadena grasa a una proteína. En este escenario, tres grupos funcionales de proteínas son capaces de crear un enlace covalente con un derivado de ácidos grasos: (i) grupos tiol de la cisteína que conducen a la formación de enlaces tioéster; (ii) grupos hidroxilo de la serina y el grupo de amina de la lisina que conduce a la formación de un enlace éster y (iii) Los extremos de las cadenas de polipéptidos que forman enlaces de amida (68).

Convencionalmente, la N-acilación de una proteína en un medio alcalino acuoso se lleva a cabo por la reacción de condensación de Schotten-Baumann (68). En estas condiciones, los grupos de aminas reaccionan principalmente con los ácidos grasos. Por lo tanto, en una proteína la amina libre está representada por el extremo terminal de las cadenas y residuos de lisina (Figura 3). La funcionalidad de las proteínas depende de su actividad superficial. En un medio acuoso, la estructura proteica se reorganiza de manera que los grupos hidrófobos se ubican en el núcleo interior, mientras que los grupos hidrófilos permanecen en el exterior de la estructura. El objetivo de la N-acilación es introducir nuevos grupos hidrófobos en la superficie de la proteína y así tener una influencia significativa en las propiedades de solubilización, gelación y emulsificante (53).

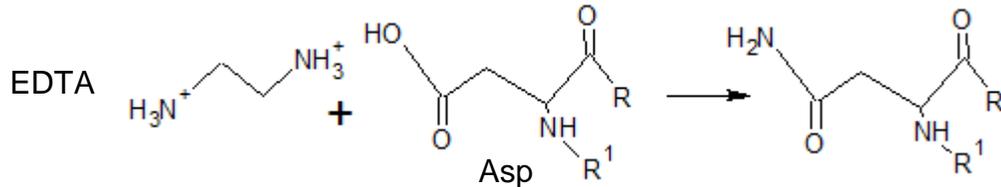
2.4.3. N-cationización de proteínas.

La reacción de N-cationización implica la generación de cargas positivas en las moléculas por injerto de grupos catiónicos (54). Esta funcionalización podría cambiar el punto isoeléctrico de las proteínas y, por lo tanto, su solubilidad en función del pH y la afinidad hacia la sustancia aniónica (68). El reactivo catiónico más ampliamente estudiado tiene una función de amonio cuaternario (54). Teóricamente, la N-cationización podría realizarse en polímeros naturales como proteínas y polisacáridos (Figura 3), ya que pueden reaccionar con una molécula que tiene una función de amonio cuaternario catiónico (68).

En general, las proteínas tienen dos grupos principales, grupos amino y carboxilo. A un pH básico, la reactividad nucleófila de los grupos amino es mayor que la de los grupos carboxilo. Por lo tanto, la reacción de N-cationización se lleva a cabo principalmente en los grupos de aminas. Actualmente, la modificación catiónica de proteínas animales se utiliza para mejorar su solubilidad, propiedades antibacterianas e hidrófilas (por ejemplo, capacidad de absorción de agua e hinchamiento) (68).



A. Reacción de N-acilación (Schotten-Baumann) en: (a.) grupo C- terminal de proteína y (b.) residuo de lisina (55).



B. Cationización inducida por ácido tetra-acético de etileno di-amina (EDTA) con ácido aspártico (Asp) (55).

Figura 3. Mecanismos de reacción de algunas modificaciones estructurales utilizadas en proteínas: (A.) Reacción de N-acilación, (B.) Reacción de N-cationización.

3. HIPÓTESIS

Es posible emplear las proteínas aisladas de fuentes vegetales; nativas y modificadas, como materiales de recubrimiento en la encapsulación del extracto de annatto por medio del proceso de gelación iónica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar las proteínas aisladas de fuentes vegetales (quinua, lentejas y frijol negro) como material de recubrimiento en la encapsulación del extracto de annatto por gelación iónica y estudiar el efecto de sus modificaciones estructurales en la capacidad encapsulante de las proteínas.

4.2. Objetivos específicos.

- Optimizar el proceso de extracción de los compuestos bioactivos de la semilla de annatto mediante la extracción con etanol asistida por ultrasonido, además de la evaluación de sus propiedades antioxidante y antimicrobiana.
- Obtener y caracterizar las proteínas nativas y sus modificaciones por medio de hidrólisis enzimática, acilación y cationización extraídas de la quinua, lentejas y frijol negro
- Evaluar la capacidad de las proteínas nativas y modificadas para encapsular el extracto de las semillas de annatto por medio de la gelación iónica.

5. METODOLOGÍA

5.1. Extracción asistida por microondas y ultrasonido de los compuestos bioactivos de las semillas de annatto.

5.1.1. Materiales.

Las semillas de annatto secas del mismo lote se compraron en la plaza de mercado minorista de Medellín (Colombia). Estas fueron secadas al sol hasta alcanzar un contenido de humedad de $10.58 \pm 0.98\%$. Todos los reactivos utilizados fueron de grado de síntesis.

5.1.2. Diseño experimental.

Las condiciones de UAE y MAE se optimizaron empleando un diseño experimental de superficie de respuesta tipo Box-Behnken (BBD) por separado para cada método de extracción, utilizando el Software® Design Expert versión 8.0.6 (Stat-Ease, USA). Las variables independientes para los dos métodos de extracción se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Niveles de las variables independientes acorde a BBD para MAE y UAE.

Variables independientes	Símbolo	Niveles		
		-1	0	+1
Tiempo de ultrasonido (min)	X ₁	0	15	30
Tiempo de microondas (min)	X ₁	0	2,5	5
pH	X ₂	4	7,5	11
Concentración de solvente (etanol) (%)	X ₃	50	73	96
Relación solvente-semillas (X ₄ :1)	X ₄	2	6	10

A partir de estas condiciones, se establecieron 30 corridas experimentales para cada método de extracción, las cuales se muestran en la Tabla 3 con su respectiva aleatorización. Las dos variables dependientes estudiadas fueron el contenido de bixina y el contenido de compuestos polifenólicos totales (28). Ambos métodos son especificados más adelante.

Tabla 3. Matriz experimental para MAE y UAE del extracto de semillas de annatto.

Tratamiento	UAE ^a (min)	pH ^{ab}	solvente (etanol) ^{ab} (%)	Solvente-semillas ^{ab} (X ₄ :1)	MAE ^b (min)
1	0,0	7,5	73,0	10,0	0,0
2	15,0	4,0	50,0	6,0	2,5
3	15,0	7,5	50,0	10,0	2,5
4	15,0	4,0	96,0	6,0	2,5
5	15,0	7,5	73,0	6,0	2,5
6	0,0	11,0	73,0	6,0	0,0
7	30,0	11,0	73,0	6,0	5,0
8	15,0	11,0	96,0	6,0	2,5
9	0,0	7,5	50,0	6,0	0,0

10	15,0	7,5	50,0	2,0	2,5
11	30,0	4,0	73,0	6,0	5,0
12	15,0	4,0	73,0	2,0	2,5
13	15,0	7,5	73,0	6,0	2,5
14	30,0	7,5	96,0	6,0	5,0
15	15,0	11,0	73,0	10,0	2,5
16	15,0	11,0	50,0	6,0	2,5
17	0,0	7,5	96,0	6,0	0,0
18	15,0	7,5	96,0	2,0	2,5
19	15,0	7,5	73,0	6,0	2,5
20	15,0	7,5	96,0	10,0	2,5
21	30,0	7,5	73,0	2,0	5,0
22	15,0	7,5	73,0	6,0	2,5
23	15,0	11,0	73,0	2,0	2,5
24	30,0	7,5	73,0	10,0	5,0
25	0,0	4,0	73,0	6,0	0,0
26	15,0	7,5	73,0	6,0	2,5
27	30,0	7,5	50,0	6,0	5,0
28	0,0	7,5	73,0	2,0	0,0
29	15,0	4,0	73,0	10,0	2,5
30	15,0	7,5	73,0	6,0	2,5

MAE: extracción asistida por microondas, UAE: extracción asistida por ultrasonido. Letras diferentes indican diseños experimentales diferentes.

Las condiciones del proceso de extracción utilizando la técnica MAE fueron: una frecuencia de 2450 MHz y una potencia de 700W (LG Ms-147xc, Seúl, Corea del Sur) exponiendo las muestras a ciclos de 30s hasta alcanzar el tiempo total establecido para las corridas experimentales MAE (Figura 4). Mientras que, para la extracción utilizando la técnica UAE se utilizó una frecuencia de 37 KHz y una potencia de 320 W (Elmasonic E30h). El ajuste del pH se realizó con soluciones al 0.1M de ácido acético e hidróxido de sodio previo al proceso de extracción.

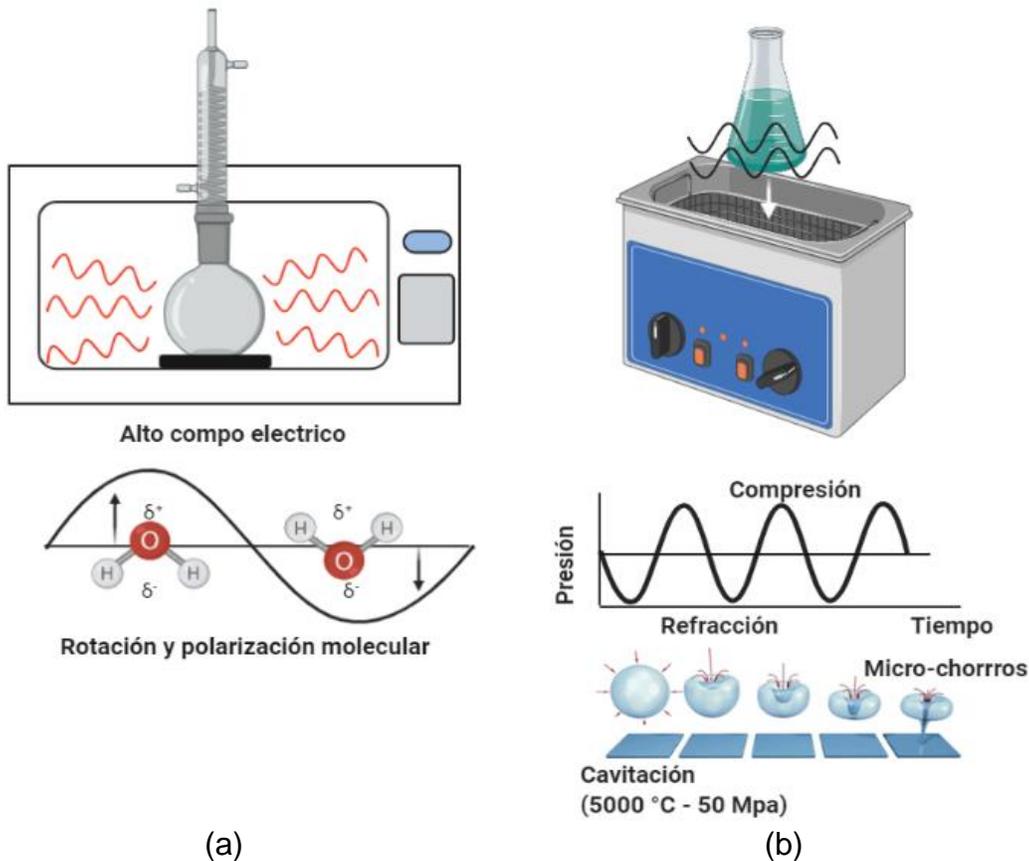


Figura 4. Esquema de sistemas de extracción (a) para la extracción asistida por microondas (MAE); (b) para la extracción asistida por ultrasonido (UAE).

El método de regresiones múltiples de mínimos cuadrados se utilizó con el fin de optimizar las condiciones de extracción e investigar el efecto de las variables independientes. Los datos experimentales se ajustaron mediante la ecuación polinómica de segundo orden (Ec. 1) en comparación con el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de determinación ajustado (r^2 -adj).

$$\begin{aligned}
 Y = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_{11} + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \\
 & + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \quad (\text{Ec. 1})
 \end{aligned}$$

Donde, Y representa la respuesta pronosticada, β_0 , es el intercepto del modelo, β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_{11} , β_{22} , β_{33} , β_{44} y β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{23} , β_{24} y β_{34} son los coeficientes lineales y de interacción, respectivamente; y X_1 , X_2 , X_3 y X_4 corresponden a las variables independientes. El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para analizar los efectos significativos (con un nivel de confianza del 95%) de las variables independientes sobre las variables dependientes. Una vez obtenidos los modelos matemáticos significativos, se optimizó el proceso de extracción, buscando maximizar la extracción de polifenoles y bixina (peso de 1 para ambos) y minimizando la relación solvente-semillas. El cálculo de los errores relativos y absolutos se logró entre las respuestas predichas por el modelo frente a las obtenidas experimentalmente en condiciones óptimas.

5.1.3. Caracterización de los extractos de semillas de annatto optimizados.

Los extractos obtenidos en condiciones óptimas por MAE y UAE se compararon con un extracto obtenido por lixiviación. Este último se obtuvo con etanol utilizando las condiciones óptimas de concentración de solvente, pH y relación solvente-semillas, con una agitación continua durante 48 h. Los extractos fueron caracterizados por su contenido de polifenoles totales, contenido de bixina, actividad antioxidante (ABTS⁺, FRAP y DPPH) y actividad antimicrobiana como se describen en los siguientes apartados.

5.1.3.1 Contenido de compuestos polifenólicos totales.

La concentración de compuestos polifenólicos en el extracto de semilla de annatto se determinó empleando el método Folin-Ciocalteu (92). 20 µL de muestra se mezcló con 1,58 µL de agua destilada, 100 µL de reactivo de Folin-ciocalteu y 300 µL de carbonato de sodio al 20 %. La absorbancia se leyó a 725 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (UV-1700, Shimadzu) después de 1h de almacenamiento bajo la oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico (GA) por gramo de muestra (mg GA/g muestra).

5.1.3.2. Cuantificación de contenido de bixina.

Se mezcló 100 µL de muestra con 2 mL de tetrahidrofurano y 10 mL de acetona para obtener una absorbancia de menos de 0,15 a 487 nm tomada en un espectrofotómetro UV/VIS (UV-1700, Shimadzu). La concentración de bixina en la muestra se determinó utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 2) (93):

$$Bixina (\%) = \frac{A \cdot 100 \cdot V}{A_{1cm}^{1\%} \cdot 100} \quad (Ec.2)$$

Donde:

$$A_{1cm}^{1\%} = 3090 \text{ (1g/100 mL)} \cdot 1 \text{ cm}^{-1} \text{ (Coeficiente de absorción específico de bixina en acetona)} \quad (93)$$

A = Valor de absorbancia de la muestra

V = Volumen de dilución de la muestra (mL)

5.1.3.3. Actividad antioxidante por ABTS⁺.

La actividad antioxidante por el método ABTS⁺ se realizó siguiendo el método descrito por Contreras et al. 2011 (94). 100 µL de muestra (diluido apropiadamente con agua) se mezcló con 1 mL de solución ABTS⁺, que se preparó con el estándar ABTS (Sal de diamonio 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) diluido en etanol. El cambio de coloración se leyó después de 30 minutos a 730 nm en un espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu). Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox (TE) ((±) - 6- Hidroxi- 2,5,7,8- tetrametilcromano- 2- ácido carboxílico) al 97%, o TE mol /L.

5.1.3.4. Actividad antioxidante, poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP).

El FRAP fue cuantificado de acuerdo a Benzie y Strain (1996) con modificaciones (95). Brevemente, se mezclaron 30 μ L de muestra, 90 μ L de agua desionizada (diluida adecuadamente con agua) y 900 μ L del reactivo FRAP (precalentado a 37°C). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C. Luego, el cambio en la coloración se leyó a 593 nm en un espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu). Se obtuvo una curva de calibración Trolox (TE) con fines de cuantificación y los resultados se expresaron como TE mol/L.

5.1.3.5. Actividad antioxidante por DPPH.

2 mL de 0,5 mM 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo o DPPH reactivo se mezcló con 2 ml de metanol y 0.2 ml de muestra (diluido adecuadamente con agua). El cambio de coloración se leyó a 517 nm en un espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu) después de 30 min de incubación en la oscuridad. Se obtuvo una curva de calibración Trolox (TE) con fines de cuantificación y los resultados se expresaron como TE mol/L (96).

5.3.6. Actividad antimicrobiana del extracto de semillas de annatto.

La actividad antibacteriana de los extractos obtenidos se evaluó contra *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Las cepas bacterianas se incubaron durante 24 h a 37 °C en un caldo Mueller-Hinton para posteriormente ser ajustadas a una escala McFarland 0,5 (106 CFU/mL). Las muestras se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 4096 mg/L y se hicieron diluciones seriadas de la primera dilución hasta alcanzar una concentración de 4 mg/L. En un microplato de 96 pozos se añadió en cada pozo 20 μ L de muestra, 120 μ L de caldo Mueller-Hinton estéril y 10 μ L de inóculo. Los controles positivos y negativos se prepararon de acuerdo con reportes anteriores (97). Después de la incubación durante 5 h a 37 °C, se añadió a cada pozo 25 μ L de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para continuar la incubación 1 h más bajo las mismas condiciones. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se consideró como la concentración del primer pozo que no sufrió ningún cambio de color (de amarillo a púrpura). El procedimiento se repitió tres veces para cada microorganismo y se evaluó el efecto del pH a 4.0, 7.0 y 11.0 sobre la actividad antimicrobiana (2).

5.2. Extracción de proteínas de quinua, lentejas y fríjol negro.

5.2.1. Materiales.

Las semillas de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*, QP), frijoles negros (*Phaseolus vulgaris* L., BP) y lentejas (*Lens culinaris Medik*, LP) se obtuvieron de la plaza minorista de Medellín (Colombia). El material vegetal fue secado en un horno (IMP180, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C durante 48 h seguido de su molienda en un molino casero y tamizaje a través de una malla número 60 (tamaño de 250 μ m). Las harinas se almacenaron en desecadores hasta su uso. Todos los reactivos utilizados fueron de grado de síntesis.

5.2.2. Caracterización fisicoquímica de las fuentes vegetales.

Las harinas vegetales obtenidas en los procesos de molienda se analizaron para determinar el contenido de humedad, proteínas, cenizas y lípidos según la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) (98). El contenido de proteína se determinó mediante el método Kjeldahl (N \times 6.25) (AOAC 2011.04), mientras que el contenido de humedad se evaluó mediante gravimetría calentando la muestra a 120 °C hasta alcanzar un peso constante (AOAC

934.06). El contenido de cenizas se determinó por calcinación en un horno a 550 °C hasta alcanzar un peso constante (AOAC 942.05). El contenido de lípidos se determinó mediante extracción Soxhlet con éter (AOAC 922.06). El contenido de polisacárido se calculó a partir de la resta de todos los compuestos sobre el 100% de la composición de las harinas.

5.2.3. Diseño experimental aplicado en la extracción asistida por ultrasonido de proteínas (UAPE) de fuentes vegetales.

Las condiciones operativas para las extracciones asistidas por ultrasonido (UAPE) se optimizaron para cada fuente vegetal utilizando un diseño experimental Box-Behnken (BBD), empleando el Software Design Expert® (Vs. 8.0.6, Stat-Ease, EE. UU.). El pH (6-10), una relación de tampón (Tris-HCL) a material (5: 1 a 15: 1 o 50 ml: 10 g a 150 ml: 10 g), una relación buffer-material (5: 1 a 15: 1) y el tiempo de ultrasonido (0 a 20 min) se tomaron como variables independientes en una matriz experimental compuesta de 17 corridas (Tabla 4). La mezcla de la harina vegetal y el buffer de extracción se llevaron en un beaker y fue sumergido en un baño de ultrasonido Elmasonic E30h a una frecuencia de 37 kHz, una potencia de 320 W y una temperatura de 25 ° C en condiciones operativas constantes. El rendimiento de proteína (% p / v) se tomó como la principal variable dependiente y se calculó mediante el método Biuret utilizando un espectrofotómetro UV / Vis (UV-1700, Shimadzu Europe®) (99,100).

Tabla 4. Matriz experimental aplicada en la extracción de proteínas de cada una de las fuentes vegetales quinua, lentejas y frijol negro.

Tratamiento	pH	Ultrasonido (min)	Relación buffer-harina vegetal (X:1)
1	6,0	10,0	5,0
2	8,0	0,0	15,0
3	6,0	0,0	10,0
4	8,0	20,0	15,0
5	6,0	10,0	15,0
6	10,0	10,0	5,0
7	8,0	10,0	10,0
8	10,0	0,0	10,0
9	8,0	10,0	10,0
10	6,0	20,0	10,0
11	10,0	10,0	15,0
12	10,0	20,0	10,0
13	8,0	10,0	10,0
14	8,0	20,0	5,0
15	8,0	10,0	10,0
16	8,0	10,0	10,0
17	8,0	0,0	5,0

Para optimizar las condiciones de extracción e investigar el efecto de las variables independientes, se utilizó el método de mínimos cuadrados de regresión múltiple. Además, la ecuación polinómica de segundo orden se ajustó a los datos experimentales mediante la comparación del coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de determinación ajustado (r^2 -adj). El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para investigar la significación estadística de las variables independientes en los modelos obtenidos (con un nivel de confianza del 95%). Las condiciones de extracción se optimizaron para obtener el mayor rendimiento de proteínas de cada fuente vegetal.

5.2.3.1. Porcentaje de rendimiento de extracción (EY).

Se determinó comparando la concentración de proteína en el sobrenadante utilizando el método de Biuret (101). El rendimiento de proteína se calculó utilizando la Ecuación 3.

$$EY (\%) = \frac{\text{proteína soluble en el buffer}}{\text{proteína total de la fuente vegetal}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

5.2.4. Caracterización de los aislados proteicos de las fuentes vegetales optimizados.

5.2.4.1. Contenido de aminoácidos de las proteínas extraídas .

El perfil de aminoácidos para cada aislado de proteína bajo condiciones optimizadas se determinó empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (serie Agilent® 1200) mediante intercambio iónico. Las proteínas se sometieron previamente a una hidrólisis ácida con HCl 6 M durante 24 h. Para el análisis se empleó una columna Zorbax Eclipse Plus® AAA-C18 (Zorbax Eclipse Plus® C18, 4,6 x 150 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m) y una pre-columna Zorbax Eclipse Plus® AAA-C18 (4,6 ID x 12,5 mm). La temperatura de la columna fue de 40 °C y las fases móviles utilizadas fueron una solución de 40 mM de buffer NaH_2PO_4 (pH 7.8) (A) y una solución de acetonitrilo/metanol/agua (10:45:45) (B) a una velocidad de flujo de 0,2 mL min^{-1} (volumen de inyección de 72 μ L). El gradiente fue lineal de 100% a 50% de B durante 20 min, seguido de 100% de A de 20 a 25 min, y se mantuvo constante con 100% de A de 25 a 36 min. Se inyectaron 25 μ L de cada muestra hidrolizada a un caudal de 2,0 mL/min . La cuantificación de aminoácidos se realizó mediante derivatización en línea usando Orto-ftalaldehído (OPA) para aminoácidos primarios, y cloroformiato de 9-fluorenil-metilo (FMOC) para aminoácidos de cadena lateral. El primero fue determinado a 338 nm y el último a 262 nm.

5.2.4.2. Caracterización fisicoquímica y propiedades funcionales de las proteínas obtenidos por UAPE.

Las proteínas obtenidas empleando las condiciones óptimas de cada fuente se precipitaron agregando sulfato de amonio hasta lograr un porcentaje de saturación del 100% sin causar desnaturación. Posteriormente, la solución se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos (Hermle Z206A) y el precipitado fue dializado usando una membrana de celulosa de 3 kDa (Fisherbrand™) durante dos días bajo enfriamiento reemplazando el medio (agua Tipo II) cada 12 h. Se realizó el mismo procedimiento omitiendo el tratamiento con ultrasonido para evaluar el efecto del ultrasonido sobre las proteínas obtenidas. Estas proteínas sin ultrasonido se

marcaron como PE. Las proteínas obtenidas con los procesos UAPE y PE se caracterizaron utilizando las siguientes metodologías:

5.2.4.2.1. Punto isoeléctrico (pI).

El punto isoeléctrico se determinó a partir del gráfico del potencial-z versus el perfil de pH. El pI corresponde al punto donde el potencial-z equivale a 0 mV. El potencial z se determinó en soluciones de proteína al 0,1% en un rango de pH de 2 a 10 usando un Zetasizer (Nano ZS90 Malvern®) (102). El pH se ajustó con soluciones de NaOH y HCl 0.1 M.

5.2.4.2.2. Peso molecular (MW).

Se determinó por electroforesis en un gel de placa de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (12%, SDS-PAGE) usando un sistema Mini-Protean® (Bio-Rad, Reino Unido). El gel cargado con las soluciones de proteína al 4,0% se corrió a 150 V. Se usó un marcador de peso molecular de proteínas (11-245 kDa, Biolabs®, Inglaterra) como patrón de referencia (103).

5.2.4.2.3. Contenido de grupos tiol (SH) libres.

Los grupos sulfhidrilo o tiol (SH) de los aislados de proteínas se determinaron de acuerdo con el método de Ellman (1959) modificado por Tang et al. (2009) (104). Brevemente, se suspendieron 15 mg del aislado proteico en 5,0 mL de buffer Tris (Tris 0,086 M, glicina 0,09 M, EDTA 4 mM, pH 8,0) y se añadieron 50 µL de reactivo Ellman (4 mg DTNB (5,5-ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzoico) en 1 mL de buffer Tris-glicina). La absorbancia del complejo formado se leyó a 412 nm (UV-1700, Shimadzu®) después de 1 h de almacenamiento bajo oscuridad a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). El contenido de SH se calculó utilizando el coeficiente de extinción de 2-nitro-5-tiobenzato (NTB) a 412 nm (13,600 M⁻¹ cm⁻¹) y se expresó como µmol SH/g de proteína.

5.2.4.2.4. Capacidad de absorción de agua (WHC) y aceite (FAC).

Ambas capacidades se determinaron de acuerdo con el método descrito por Boye et al. en 2010 (105). Para determinar FAC se pesó ~0.5 g de muestra y se mezcló con 3.0 mL de aceite de girasol en un tubo Falcon seguido de homogeneización durante 1 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4.000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante se desechó. Se pesó el residuo resultante en los tubos y se calculó el % de FAC basado en la Ec. 4. Del mismo modo, para evaluar WHC se pesó ~1,0 g de muestra y se le agregó suficiente agua para saturar la muestra sin formar una dispersión líquida. Las muestras se homogeneizaron por 1 min y se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el WHC se expresó como el porcentaje de agua absorbida por las proteínas (Ecuación 4).

$$FAC \text{ o } WHC (\%) = \frac{\text{Peso del aceite o agua absorbida por la muestra}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

5.2.4.2.5. Capacidad EAI (m^2/g) y estabilidad ESI (min) emulsificante.

Se determinó basado a la metodología de Boye et al. en 2010 (105). Fueron añadidos 1,5 mL de aceite a 4,5 mL de solución de cada proteína (0,5% p/v) preparada en buffer fosfato 0,01 M pH 7 para ser homogenizada a 20.000 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos usando un eje de 5 mm (ds-500/5, Dlab). Posteriormente, se mezclaron 250 μ L de la emulsión en 5,0 mL de solución de dodecil sulfato de sodio al 0,1%, y se leyó la absorbancia a 500 nm empleando un espectrofotómetro UV/VIS (UV-1700, Shimadzu®). El índice de actividad emulsionante (EAI) y el índice de estabilidad emulsionante (ESI) se calcularon según las ecuaciones 5 y 6 (106)

$$EAI (m^2/g) = \frac{2 \cdot 2.303 \cdot A_0 \cdot N}{c \cdot \varphi \cdot 10000} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$ESI (m^2/g) = \frac{A_0 \cdot t}{\Delta A} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde, A_0 es la absorbancia de la emulsión diluida justo después de la homogenización, N es el factor de dilución ($\times 150$), c es el peso de proteína por volumen (g/mL), φ es la fracción de volumen de aceite de la emulsión, ΔA es El cambio en la absorbancia entre 0 y 10 min ($A_0 - A_{10}$) y t es el intervalo de tiempo de 10 min (105).

5.2.4.2.6. Temperatura de gelación (T_g).

La temperatura de gelación se determinó con las propiedades visco-elásticas de las soluciones proteicas según lo descrito por Zhao et al. en 2014 (107). El módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') fueron los parámetros reológicos determinados en un reómetro MCR92 (Anton Paar Corporation, Austria). Los parámetros reológicos se determinaron a las soluciones proteicas (5,0 % p/v) usando una geometría de cilindro concéntrico C-CC27/T200XL. Para inducir la formación de gel, las muestras se sometieron a una rampa de calentamiento compuesta de tres pasos: una rampa ascendente de 25 °C a 80 °C, seguido de una rampa de sostenimiento a 80 °C durante 5 min, y una rampa descendente de 80 °C a 25 °C. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento fueron de 1 °C/min. Las mediciones se registraron con una deformación por cizallamiento de 0,1% y una frecuencia angular de 1,0 s^{-1} donde las muestras permanecieron dentro de la región lineal visco-elástica. La T_g se determinó como la temperatura en donde G' tuvo un incremento instantáneo y significativo que supero a G'' .

5.2.4.2.6. Análisis de componentes principales (PCA).

El análisis de componentes principales (PCA), análisis de conglomerados y matriz de correlación (cuadrado euclidiano) fueron realizados empleando el software Minitab® (vs. 17.2.1). El análisis multivariado permite condensar el conjunto de datos contenidos en las variables originales en un conjunto más pequeño de nuevos vectores con una pérdida mínima de datos. PCA es el método más exitoso para el análisis factorial. Para el análisis de los datos experimentales obtenidos, se empleó la regla Kaiser-Guttman debido a su simplicidad y disponibilidad (108).

5.3. Estandarización del proceso de encapsulación por gelación iónica con proteínas vegetales como material de recubrimiento.

5.3.1. Proteínas de fuentes vegetales.

Los aislados proteicos de quinua, lentejas y fríjol negro fueron obtenidos con las condiciones óptimas de extracción evaluadas con la metodología reportada en la sección 5.2. Las proteínas así obtenidas se liofilizaron marca Biosfer a una presión de ~10 Mbar a una temperatura de sublimación de -40°C y se almacenaron en bolsas al vacío en desecadores hasta su uso posterior. El contenido proteico se evaluó de acuerdo con los métodos de AOAC (98), dando rendimientos de $35,0 \pm 2,03$ %, $65,0 \pm 1,87$ % y $41,4 \pm 2,98$ % (N-5,3) para los aislados proteicos de quinua, fríjol negro y lentejas, respectivamente.

5.3.2. Estudio reológico como herramienta de estandarización de condiciones de concentración, pH, temperatura de gelación y presencia de iones Ca^{2+} .

Las pruebas reológicas tales como curvas de flujo, barridos de frecuencia y barridos de temperatura son ensayos que permiten estudiar el comportamiento viscoelástico y capacidad de formación de geles de moléculas, esta última capacidad siendo primordial en el procesos de encapsulación por gelación iónica (40,109). Para la evaluación de estas pruebas reológicas se empleó un reómetro MCR 92 marca Anton Paar (Graz, Austria) junto con el software Rheocompass® (v.1.20, Anton Paar) y una geometría de cilindro concéntrico C-CC27 (27 mm de diámetro) y cono plato CP50-1 (50 mm de diámetro y 1° de inclinación). Para determinar el efecto de la concentración en la capacidad gelificante de los aislados proteicos se prepararon y evaluaron soluciones de cada proteína de fuente vegetal con unas concentraciones de 2,5, 5,0 y 10,0 % (p/v) a un pH de 7,0. El efecto del pH en el proceso de gelación fue evaluado en soluciones proteicas concentradas al 5,0% (p/v) ajustada a pHs de 5,0, 7,0 y 9,0 con soluciones de NaOH o HCl al 0,1M. El efecto de los iones Ca^{2+} se evaluó en soluciones proteicas concentradas al 5,0 % (p/v) y pH de 7,0. Se empleó CaCl_2 al 1,0% (p/v) como fuente de iones Ca^{2+} . El efecto de la temperatura fue evaluado para todas las muestras en el barrido de temperatura que fue realizada para cada una.

5.3.2.1. Comportamiento del flujo.

Las curvas de flujo se obtuvieron de acuerdo con la metodología descrita por Zhu et al. (2018) con algunas modificaciones (109). Fue tomada una muestra de 20mL aproximadamente y se midió la viscosidad absoluta (η) junto con la tensión de cizallamiento en función de la velocidad de cizallamiento en tres etapas a 25°C, primero una etapa ascendente ($0,01-100 \text{ s}^{-1}$) con una duración de 60s, segundo una velocidad de cizallamiento constante (100 s^{-1}) con una duración de 60s, y una tercera etapa descendente ($100-0,01 \text{ s}^{-1}$) con una duración de 60s (109). Los datos se ajustaron al modelo de Herschel Hulkley (mejor ajuste según el coeficiente de determinación) y se estimó el índice de consistencia (K) y el comportamiento de flujo (n) para cada solución proteica.

5.3.2.2. Ensayos oscilatorios, barridos de frecuencia.

Inicialmente, la región lineal viscoelástica (LVR) se evaluó en una solución proteica al 2,5% (p/v) y pH 7 de cada fuente vegetal. La frecuencia angular para determinar LVR fue constante a 1 s^{-1} y una amplitud que oscilo entre 0,01 y 100%. Una vez que se calculó el LVR los barridos

de frecuencia para cada solución proteica se realizaron variando la frecuencia angular entre 10 a 0,01 rad/s a una temperatura constante de 25°C. Esta prueba determinó los módulos de almacenamiento (G) y pérdida (G'') y el ángulo de desfase (δ) (110).

5.3.2.3. Barrido de temperatura.

El barrido de temperatura se utilizó para determinar la temperatura de gelación (T_g) de las proteínas. Con el fin de inducir la formación de gel, las muestras se sometieron a una rampa de calentamiento compuesta por tres pasos: la primera etapa entre temperaturas de 25°C a 80°C, seguida de la segunda etapa a una temperatura constante de 80°C durante 5min, y una tercera etapa de enfriamiento de 80°C a 25°C. Las tasas de calentamiento y enfriamiento fueron establecidas a 1°C/min. Los módulos de almacenamiento (G) y de pérdida (G'') se midieron en una amplitud acorde a LVR y una frecuencia angular de 1,0 rad/s (107).

5.3.3. Definición de condiciones del proceso de encapsulación por gelación iónica.

Esta metodología fue realizada con el fin de elegir parámetros como el tiempo de calentamiento, pH óptimo y concentración de proteína en la solución para el proceso de encapsulación que mejor se adapten al mecanismo de gelación iónica. Las condiciones evaluadas fueron el tiempo de calentamiento a una temperatura mayor a T_g (10-30-60-120 min) y el pH de la solución en el rango de mayor capacidad gelificante (definida en los resultados obtenidos con la metodología de la sección 5.3.2.); concentración de solución proteica (definida en los resultados obtenidos con la metodología de la sección 5.3.2.). Este proceso fue aplicado a las proteínas vegetales QP, BP y LP obtenidas bajo las condiciones óptimas estudiadas y además se emplearon el aislado de proteína de soja (SP) y el caseinato de sodio (SCP) ambas marca Bell-chem (Bell-chem International S.A.S, Medellín, Colombia) como controles de materiales de recubrimiento. Para este proceso las proteínas se suspendieron en una solución acuosa a la concentración definida para cada ensayo y se agitaron a temperatura ambiente durante 12h. Posteriormente fue ajustado el pH, las soluciones se sometieron al tratamiento térmico a las condiciones de temperatura y tiempo definidas para cada ensayo y finalmente las soluciones de proteínas fueron sometidas a un proceso de homogenización (Ultra-Turrax T18, IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) a 8.000 rpm durante 1min. Una vez homogenizadas las muestras fueron extruidas manualmente utilizando una jeringa con aguja calibre 21 sobre una solución de CaCl₂ al 10% a las concentraciones de los niveles definidos.

5.4. Modificación estructural de las proteínas vegetales y evaluación de su capacidad encapsulante por gelación iónica.

5.4.1. Modificación estructural de proteínas.

Las proteínas de SP como proteína de referencia y las proteínas vegetales con capacidad encapsulante fueron modificadas estructuralmente por las técnicas de hidrólisis enzimáticas, N-acilación y N-cationización con las metodologías que se describen a continuación.

5.4.1.1. Hidrólisis enzimática de proteínas.

Cada uno de los concentrados de proteína fueron sometidos al proceso de hidrólisis enzimática utilizando Alcalasa 2.4L grado alimentario (Novozymes, Denmark) con una actividad

enzimática de 2.45 ± 0.07 AU/g. La relación enzima / sustrato se estableció en 1: 100 (p / p), la temperatura de reacción a 50°C y un pH 8,0 de la dispersión, tanto la temperatura como el pH se mantuvieron constantes durante todo el período de hidrólisis (15 o 60 min) mediante el uso de un baño de calentamiento marca LAUDA y la adición de NaOH 4 M. La reacción se terminó ajustando el pH de la solución a 4,5 con una solución de HCl 4 M. Después del período de reacción, la mezcla se congeló y se liofilizó usando un equipo marca Biobase FD12PT a <10 Pa. Los hidrolizados molidos y tamizados a través de una malla número 60 (tamaño de $250 \mu\text{m}$) fueron almacenados a 4°C hasta su uso (87,111).

El grado de hidrólisis (DH%) fue determinado el método de o-phthaldialdehyde descrito por Nielsen, Petersen y Dambmann (2001) (112), que mide la reacción entre el grupo amino libre (NH_2), o-phthaldialdehyde (OPA) y ditiotreitól (DTT). Para obtener el reactivo de OPA, 160 mg de OPA fueron disueltos en 4 mL de etanol y mezclados con 150 mL de una solución con 7,62 g de tetraborato de sodio decahidratado y 200 mg de dodecil sulfato de sodio. Posteriormente se agregó 176 mg de DTT y se aforó la solución hasta 200 mL con agua desionizada. Se usó serina ($0,9516 \text{ meqv} / \text{L}$) como estándar. Se agregaron un total de $400 \mu\text{L}$ de muestra de hidrolizado o estándar de serina con 3 ml de reactivo OPA y se mezclaron durante 5 s. Las mezclas se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia del cromóforo formado fue leído en un espectrofotómetro UV/VIS (UV-1700, Shimadzu) en una longitud de onda de 340 nm. El grado de hidrólisis fue determinado acorde a la ecuación 7 (113).

$$\text{DH}(\%) = \frac{N_i - N_T}{N_T - N_0} * 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

N_i = total de mEq serina/gramo de proteína en la muestra hidrolizada

N_0 = total de mEq serina/gramo de proteína en la muestra no hidrolizada

N_T = total de mEq serina/gramo de proteína en la muestra totalmente hidrolizada

5.4.1.2. N-acilación de proteínas.

La reacción de N-acilación fue realizada en las soluciones de proteínas al 10 % usando cloruro de dodecanoilo (DDC) en una relación molar de DDC/ NH_2 de la proteína usada de 0.5/1. Durante 180 min de reacción de N-acilación, la temperatura y el pH se mantuvieron constantes a 50°C y pH 10.0 mediante la adición de una solución de NaOH 4 M (87). Posteriormente, la mezcla se liofilizó y el polvo se tamizó y se almacenó a 4°C . El grado de acilación (DA) (ecuación 8) se determinó por el método OPA de acuerdo al mismo protocolo empleado para la determinación de DH.

$$\text{DA}(\%) = \frac{N_0 - N_a}{N_0} * 100 \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

N_a = total de mEq serina/gramo de proteína en la muestra con N-acilación

N_0 = total de mEq serina/gramo de proteína en la muestra sin N-acilación

5.4.1.3. N-cationización de proteínas.

La reacción de N-cationización fue realizada en las soluciones de proteínas al 10 % usando cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMAC) en una relación molar de GTMAC / NH_2 de la proteína usada de 4/1. Durante 60 min de reacción de N-cationización, la temperatura y el pH se mantuvieron constantes a 60°C y pH 10.0 mediante la adición de una solución de NaOH 4 M (54,68). Posteriormente, la mezcla se liofilizó y el polvo se tamizó y se almacenó a 4°C. El grado de acilación (DC) (ecuación 9) se determinó por el método OPA de acuerdo al mismo protocolo empleado para la determinación de DH.

$$DC(\%) = \frac{N_0 - N_c}{N_0} * 100 \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde:

N_c = total de mEq serina/gramo de proteína en la muestra con N-acilación

N_0 = total de mEq serina/gramo de proteína en la muestra sin N-acilación

5.4.2. Caracterización fisicoquímica y propiedades funcionales de las proteínas modificadas.

Una vez obtenidas las proteínas modificadas estructuralmente por hidrólisis enzimáticas, N-acilación y N-cationización fueron caracterizadas bajo los siguientes parámetros:

5.4.2.1. Espectroscopia de transmisión infrarroja (FT-IR) y estructura secundaria de las proteínas.

El análisis FT-IR se realizó en los aislados de proteínas, para lo que fue empleado un espectrómetro PerkinElmer Two FT-IR (Massachusetts, Estados Unidos). Los espectros infrarrojos se leyeron en un rango de 4000-400 cm^{-1} . Los espectros obtenidos fueron sometidos a una auto-deconvolución de Fourier (FSD), análisis de segunda derivada y picos superpuestos en la región amida-I (1.700 a 1.600 cm^{-1}) usando el software PeakFit® V4.12. Las proporciones relativas de las diferentes subestructuras secundarias se determinaron calculando áreas bajo la curva de los picos obtenidos en la región amida-I (114).

5.4.2.2. Punto isoeléctrico (pI).

El punto isoeléctrico se determinó a partir del gráfico del potencial-z versus el perfil de pH como se describe en la sección 5.2.4.2.1.

5.4.2.3. Peso molecular (MW).

Se determinó por electroforesis en un gel de placa de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (12%, SDS-PAGE) usando un sistema Mini-Protean® (Bio-Rad, Reino Unido) como se describe en la sección 5.2.4.2.2.

5.4.2.4. Contenido de grupos tiol (SH) libres.

Los grupos sulfhidrilo o tiol (SH) de los aislados de proteínas se determinaron de acuerdo con el método descrito en la sección 5.2.4.2.3.

5.4.2.5. Capacidad de absorción de agua (WHC) y aceite (FAC).

Ambas capacidades se determinaron de acuerdo con el método descrito en la sección 5.2.4.2.4.

5.4.2.6. Capacidad EAI (m^2/g) y estabilidad ESI (min) emulsificante.

Se determinó basado a la metodología de descrita en la sección 5.2.4.2.5. Adicionalmente, a las emulsiones obtenidas se les determino el potencial-z (sección 5.2.4.2.1.) como parámetro de estabilidad.

5.4.2.7. Temperatura de gelación (Tg).

La temperatura de gelación se determinó empleando la metodología descrita en la sección 5.2.4.2.6.

5.4.2.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El comportamiento térmico de las proteínas se evaluó utilizando un dispositivo DSC (Q2000, TA Instruments, New Castle, DE, EE. UU.) calibrado con indio a una temperatura modulada y las pruebas se realizan en atmósfera de Nitrógeno bajo una corriente constante de 30 ml / min. Aproximadamente, se colocaron 2.0 mg de muestra en un crisol de aluminio sellado y se usó un crisol de aluminio sellado vacío como referencia. Se recogieron termogramas entre 20 y 150 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C / min (115).

5.4.2.9. Solubilidad de las proteínas.

La solubilidad de las proteínas obtenidas se determinó en función del pH entre el rango de 2 a 12 ajustado con soluciones de NaOH 4M y HCL 4M. Las dispersiones acuosas a 1mg/mL ajustadas al pH fueron homogenizadas durante 30 min y centrifugadas por 15 min a 14.000 g. El sobrenadante obtenido fue separado y secado en estufa de convección a 105°C hasta peso constante. El porcentaje de solubilidad de la proteína se calculó con la diferencia entre el peso inicial y el peso solubilizado (111,116).

5.4.3. Determinación de la capacidad encapsulante de las proteínas modificadas.

Las proteínas de SP y las proteínas vegetales con capacidad encapsulante en su estado nativo y modificado se emplearon como materiales de recubrimiento en el proceso de encapsulación por gelación iónica del extracto de annatto y un colorante rojo hidrofílico grado alimentario (Bell-chem International S.A.S, Medellín, Colombia). La metodología empleada para el proceso de encapsulación fue la descrita en la sección 5.3.

5.4.3.1. Eficiencia de encapsulación del annatto por gelación iónica.

La eficiencia de encapsulación del extracto de annatto empleando las proteínas nativas y modificadas como materiales de recubrimiento se determinó mediante la metodología de cuantificación indirecta (117). Inicialmente, la concentración de bixina en las dispersiones del material de recubrimiento y el extracto se determinó antes de la encapsulación. Después del proceso de encapsulación, este mismo compuesto se cuantifico en el sobrenadante siguiendo las metodologías descritas en los apartados 5.1.3.2. La eficiencia de encapsulación del extracto se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 10).

$$\%EE = \frac{m_a - m_b}{m_a} * 100 \quad (10)$$

Donde:

ma = Compuesto bioactivo inicial

mb = Compuesto bioactivo no encapsulado.

5.4.3.2. Eficiencia de encapsulación del colorante hidrosoluble por gelación iónica.

La eficiencia de encapsulación del colorante rojo punzo empleando las proteínas nativas y modificadas como materiales de recubrimiento fue determinada empleando la metodología descrita en la sección 5.4.3.1. Para determinar la concentración del colorante en el sobrenadante del proceso de encapsulación, se empleó una curva de calibración del colorante entre 15 mg/L a 500 mg/L. Las absorbancias de las soluciones fueron leídas a 524 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Genesys 10S UV-VIS, Thermo scientific, EE.UU.).

5.4.4. Análisis estadístico.

Los resultados se presentaron como el promedio con su respectiva desviación estándar (SD). Una ANOVA multivariada fue empleada en el análisis de las eficiencias de encapsulación en los procesos de encapsulación del colorante y extracto de annatto con las proteínas nativas y modificadas. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics® Centurion XVI. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

5.5. Encapsulación y estabilidad del extracto de annatto por gelación iónica empleando proteínas vegetales como material de recubrimiento.

5.5.1. Obtención del extracto de annatto.

El extracto de semillas de annatto se obtuvo con las condiciones optimizadas estudiadas bajo la metodología descrita en la sección 5.1. Posterior a la extracción el extracto fue liofilizado y almacenado a ~-4°C hasta su uso.

5.5.2. Extracción de proteínas de fuentes vegetales.

Las proteínas vegetales empleadas fueron las proteínas que presentaron capacidad encapsulante estudiadas bajo la metodología descrita en la sección 5.3., obtenidas bajo las condiciones óptimas.

5.5.3. Encapsulación del extracto de annatto por gelación iónica.

Las proteínas de SP, SCP y las proteínas vegetales con capacidad encapsulante se suspendieron en una solución acuosa a las condiciones establecidas con la metodología de la sección 5.3.1. Posteriormente, se añadió el extracto de annatto a una relación núcleo:pared de 1:5, utilizando un homogeneizador (Ultra-Turrax T18, IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) a 8.000 rpm durante 1min. Una vez homogenizadas las muestras, fueron extruidas manualmente utilizando una jeringa con aguja calibre 21 sobre una solución de CaCl₂ al 10% dejándolas en la solución durante 15 min. Una vez obtenidas las cápsulas se sumergieron en una solución de glutaraldehído al 0,01% durante 1min y luego se lavaron con agua destilada, se filtraron y se liofilizaron. Las cápsulas se caracterizaron por su eficacia de encapsulación, tamaño de partícula, espectroscopia de transmisión infrarroja, microscopia electrónica de barrido y

microscopía confocal. El contenido y estabilidad de los compuestos polifenólicos y la bixina encapsulados se analizaron a diferentes temperaturas de almacenamiento (4°C, 25°C y 65°C) durante 12 días. Las muestras se analizaron cada 4d. Además, se evaluaron las actividades antimicrobianas y antioxidantes (FRAP y SOD) en la etapa inicial y final del almacenamiento de cada encapsulado. Para la ruptura de la cápsula, los encapsulados y el extracto libre fueron diluidos en una solución de citrato de sodio al 1,0%: DMSO (1:1) (~ 0,1g de muestra liofilizada suspendida en 30 mL de solución).

5.5.4. Cuantificación de los compuestos polifenólicos totales.

Los polifenoles se determinaron de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 5.1.3.1.

5.5.5. Cuantificación de bixina total.

El extracto de semilla de annatto previamente diluido (~ 0,1 g de muestra liofilizada suspendida en 30,0 mL de agua DI) se diluyó nuevamente con acetona para obtener una absorbancia por debajo de 1,0 a 486 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Genesys 10S UV-VIS, Thermocientífic, Estados Unidos). Los mg de bixina por gramo de muestra se calcularon usando una curva de calibración del estándar de bixina entre 12,5 mg/L a 0,19 mg/L de concentración (93).

5.5.6. Actividad antioxidante, poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP).

El FRAP se midió como se describió anteriormente con algunas modificaciones (95). Se mezclaron 100 µL de muestra (~ 0,1mg de muestra liofilizada suspendida en 30,0mL de agua DI) con 900 µL de agua desionizada y 2,0 mL del reactivo FRAP que contiene 2,4,6-tri-(2-piridil) -1,3,5-triazina (TPTZ) solución 10 mM, solución FeCl₃-6H₂O 20 mM y tampón acetato 0,3 mM a pH 3,6 en una relación 1:1:10, respectivamente. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. La absorbancia fue leída a 593 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Genesys 10S UV-VIS, Thermo scientific, Estados Unidos). Se usó una curva de calibración Trolox®. Los resultados se expresaron como µmol TE/L.

5.5.7. Actividad antioxidante, actividad de eliminación del radical superóxido (SOD).

La actividad de eliminación de aniones superóxido se midió de acuerdo con el método descrito por Robak y Gryglewski (118). 3,0 mL de buffer Tris-HCl (16 mM, pH 8,0), 250 µL de solución de nitroazul de tetrazolio (NBT) (0,3 mM), 250 µL de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (0,936 mM), 500 µL de muestra (~ 0,1 g de muestra liofilizada suspendida en 30,0mL de agua DI) y 250 µL de buffer Tris-HCl (16 mM, pH 8.0) se mezclaron en ese orden. Posteriormente, se añadieron 250 µL de solución de metosulfato de fenazina (PMS) (0,12 mM) a la mezcla para comenzar la reacción. La reacción continuó durante 5min a 25°C y la absorbancia se leyó a 560 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Genesys 10S UV-VIS, Thermo scientific, EE.UU.). Se usó una curva de calibración Trolox®. Los resultados se expresaron como µmol TE / L.

5.5.8. Actividad antimicrobiana de extractos de semillas de annatto, porcentaje de inhibición.

El porcentaje de inhibición contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* fue determinado usando la técnica de microdilución en caldo descrita en el apartado 5.3.6. El porcentaje de inhibición se determinó a 630 nm usando un lector de microplatos (ELx808, Biotek Instruments Inc., VT, EE. UU.) aplicando la ecuación 11.

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \frac{As*100}{Ac1+Ac2} \quad (\text{Ec.11})$$

Donde:

As = Absorbancia de la muestra

Ac1= Absorbancia de la muestra sin microorganismo

Ac2= Absorbancia del microorganismo

5.5.9. Eficiencia de encapsulación.

La eficiencia de encapsulación del extracto de annatto se determinó mediante la metodología de cuantificación indirecta (117). Inicialmente, la concentración de bixina y polifenoles totales en las dispersiones del material de recubrimiento y el extracto se determinó antes de la encapsulación. Después del proceso de encapsulación, estos mismos compuestos se cuantificaron en el sobrenadante siguiendo las metodologías descritas en los apartados 5.1.3.1. y 5.1.3.2. La eficiencia de encapsulación del extracto se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 12).

$$\%EE = \frac{m_a - m_b}{m_a} * 100 \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde:

ma = Compuesto bioactivo inicial

mb = Compuesto bioactivo no encapsulado.

5.5.10. Microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se utilizó un modelo de microscopio confocal de banda ancha TCS SP5 II (Leica Microsystems, Exton, PA, EE. UU.) para capturar las imágenes confocales de las microcápsulas. Se usó el software LASAF (conjunto de aplicaciones Leica) para el análisis de imágenes. La línea de fluorescencia fue excitada a 488 nm con láser de argón recogido en dos canales de emisión separados de planos de imagen seleccionados, uno de 400 a 500 nm para autofluorescencia intrínseca y el otro de 500 a 600 nm para resolver la distribución del extracto en las muestras (119). Para SEM, las cápsulas liofilizadas se mantuvieron preparadas con una capa adhesiva de grafito y recubiertas con oro; las micrografías se tomaron en un equipo termoiónico (JEOL-JSM 6490LV) a temperatura ambiente y con un acelerador de voltaje de 20 kV (120).

5.5.11. Medición de tamaño de partícula.

El tamaño de partícula se calculó mediante análisis de imagen digital (120). Se tomaron fotografías de las cápsulas con una cámara digital y se analizaron alrededor de 1000 partículas por foto para determinar su tamaño con la ayuda del software gratuito ImageJ® (120).

5.5.12. Espectroscopia de transmisión infrarroja (FT-IR).

El análisis FT-IR se realizó en los aislados de proteínas, el extracto libre y los extractos encapsulados. Se utilizó un espectrómetro PerkinElmer Two FT-IR (Massachusetts, Estados Unidos). Los espectros infrarrojos se leyeron en un rango de 4000-400 cm⁻¹.

5.5.13. Análisis estadístico.

Los resultados se presentaron como el promedio con su respectiva desviación estándar (SD). El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics® Centurion XVI. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracción asistida por microondas y ultrasonido de los compuestos bioactivos presentes en las semillas de annatto (Anexo 1 y 2).

6.1.1. Diseño experimental para la optimización de MAE y UAE.

La matriz experimental estaba compuesta por 30 corridas para ambos procesos de extracción. Las variables respuestas fueron cuantificadas por triplicado y los resultados tabulados de cada ejecución experimental se describen en la Tabla 5. Los valores máximos para cada variable respuesta fueron obtenidos cuando se utilizó la técnica de MAE a las siguientes condiciones del proceso: 2,5min de tiempo para MAE, pH de 11 y una relación solvente-semillas 6:1, obteniéndose un extracto con 4,16 ± 0,24 mg de GA/g para compuestos polifenólicos y 0,58 ± 0,01% de bixina. La única variación entre las extracciones correspondió a la concentración de solvente utilizado a un 50% para la extracción máxima de compuestos polifenólicos y 96% para la extracción máxima de bixina.

Tabla 5. Matriz experimental y contenido de compuestos polifenólicos y bixina para MAE y UAE del extracto de semillas de annatto.

MAE (min)	UAE (min)	pH	solvente (etanol) (%)	Solvente- semillas (X4:1)	MAE		UAE	
					Polifenoles (mg AG/g semilla)	Bixina (%)	Polifenoles (mg AG/g semilla)	Bixina (%)
0,0	0,0	7,5	73,0	10,0	2,83 ± 0,04	0,13 ± 0,00	1,57 ± 0,09	0,17 ± 0,05
2,5	15,0	4,0	50,0	6,0	1,53 ± 0,22	0,03 ± 0,00	1,50 ± 0,01	0,15 ± 0,03
2,5	15,0	7,5	50,0	10,0	2,85 ± 0,19	0,05 ± 0,00	1,92 ± 0,01	0,32 ± 0,03
2,5	15,0	4,0	96,0	6,0	1,96 ± 0,06	0,33 ± 0,04	2,15 ± 0,13	0,54 ± 0,04
2,5	15,0	7,5	73,0	6,0	1,96 ± 0,15	0,05 ± 0,01	2,06 ± 0,06	0,31 ± 0,02
0,0	0,0	11,0	73,0	6,0	2,01 ± 0,08	0,13 ± 0,02	1,90 ± 0,15	0,38 ± 0,03
5,0	30,0	11,0	73,0	6,0	1,35 ± 0,05	0,32 ± 0,01	1,80 ± 0,02	0,67 ± 0,06

2,5	15,0	11,0	96,0	6,0	3,94 ± 0,00	0,51 ± 0,01	2,17 ± 0,03	0,57 ± 0,06
0,0	0,0	7,5	50,0	6,0	3,79 ± 0,07	0,04 ± 0,01	1,59 ± 0,11	0,17 ± 0,01
2,5	15,0	7,5	50,0	2,0	0,53 ± 0,08	0,27 ± 0,03	1,11 ± 0,13	0,12 ± 0,08
5,0	30,0	4,0	73,0	6,0	4,16 ± 0,24	0,19 ± 0,00	2,03 ± 0,05	0,39 ± 0,01
2,5	15,0	4,0	73,0	2,0	0,83 ± 0,06	0,12 ± 0,01	1,11 ± 0,02	0,39 ± 0,01
2,5	15,0	7,5	73,0	6,0	1,89 ± 0,14	0,05 ± 0,01	1,86 ± 0,07	0,31 ± 0,01
5,0	30,0	7,5	96,0	6,0	1,72 ± 0,15	0,19 ± 0,00	2,05 ± 0,15	0,50 ± 0,03
2,5	15,0	11,0	73,0	10,0	3,25 ± 0,57	0,04 ± 0,01	2,49 ± 0,15	0,20 ± 0,02
2,5	15,0	11,0	50,0	6,0	4,36 ± 0,04	0,03 ± 0,00	1,57 ± 0,06	0,19 ± 0,00
0,0	0,0	7,5	96,0	6,0	2,43 ± 0,01	0,58 ± 0,01	1,76 ± 0,13	0,22 ± 0,01
2,5	15,0	7,5	96,0	2,0	0,66 ± 0,01	0,38 ± 0,03	1,53 ± 0,09	0,54 ± 0,00
2,5	15,0	7,5	73,0	6,0	1,96 ± 0,08	0,06 ± 0,01	2,11 ± 0,14	0,33 ± 0,01
2,5	15,0	7,5	96,0	10,0	2,10 ± 0,01	0,13 ± 0,00	2,85 ± 0,06	0,64 ± 0,03
5,0	30,0	7,5	73,0	2,0	0,70 ± 0,01	0,07 ± 0,02	1,50 ± 0,13	0,39 ± 0,02
2,5	15,0	7,5	73,0	6,0	1,90 ± 0,23	0,04 ± 0,00	1,85 ± 0,24	0,27 ± 0,05
2,5	15,0	11,0	73,0	2,0	0,68 ± 0,03	0,17 ± 0,01	1,57 ± 0,18	0,47 ± 0,02
5,0	30,0	7,5	73,0	10,0	2,15 ± 0,16	0,10 ± 0,01	2,72 ± 0,14	0,38 ± 0,02
0,0	0,0	4,0	73,0	6,0	2,28 ± 0,01	0,12 ± 0,03	1,42 ± 0,11	0,24 ± 0,03
2,5	15,0	7,5	73,0	6,0	2,02 ± 0,03	0,08 ± 0,00	2,16 ± 0,12	0,33 ± 0,01
5,0	30,0	7,5	50,0	6,0	3,90 ± 0,30	0,08 ± 0,00	1,33 ± 0,09	0,27 ± 0,01
0,0	0,0	7,5	73,0	2,0	1,57 ± 0,30	0,25 ± 0,01	1,47 ± 0,06	0,38 ± 0,04
2,5	15,0	4,0	73,0	10,0	1,96 ± 0,15	0,33 ± 0,01	2,33 ± 0,09	0,28 ± 0,01
2,5	15,0	7,5	73,0	6,0	1,91 ± 0,18	0,06 ± 0,02	2,03 ± 0,01	0,35 ± 0,04

Valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 3). MAE: extracción asistida por microondas, UAE: extracción asistida por ultrasonido, AG: ácido gálico.

El ANOVA se utilizó para evaluar la importancia de los modelos polinómicos cuadráticos. Para cada término de los modelos y un *p*-valor pequeño implicarían un efecto estadísticamente significativo en la variable dependiente respectiva (121). Los valores del análisis ANOVA para los MAE y UAE se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Tabla ANOVA para el diseño de experimentos de la MAE y UAE de compuestos bioactivos del extracto de semillas de annatto.

Variable	MAE		UAE	
	Polifenoles (mg AG/g semilla)	Bixina (%)	Polifenoles (mg AG/g semilla)	Bixina (%)
	<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor
Modelo	< 0,001	< 0,0001	< 0,001	< 0,001
X ₁ -tiempo del tratamiento (min)	< 0,001	< 0,0001	> 0,050	0,006
X ₂ -pH	0,532	0,112	> 0,050	0,065
X ₃ - concentración del solvente (%)	< 0,001	< 0,001	0,0001	< 0,001
X ₄ - relación solvente-semillas (X ₄ :1)	< 0,001	0,677	< 0,001	0,003

X ₂ X ₃	0,001	>0,050	>0,050	>0,050
X ₂ X ₄	0,044	0,001	>0,050	>0,050
X ₃ X ₄	>0,050	0,004	>0,050	< 0,001
X ₂ X ₂	>0,050	< 0,001	>0,050	>0,050
X ₄ X ₄	< 0,001	>0,050	>0,050	>0,050
X ₁ X ₁	< 0,001	< 0,001	>0,050	>0,050
X ₄ X ₁	0,058	0,057	0,036	0,023
Carencia de ajuste	0,768	0,897	0,058	0,057
r ²	0,731	0,872	0,768	0,897
r ² -ajustado	0,058	0,057	0,731	0,872

MAE: extracción asistida por microondas, UAE: extracción asistida por ultrasonido, AG: ácido gálico.

La evaluación de las variables independientes estudiadas para los procesos de MAE y UAE; el tiempo de tratamiento, la concentración de solvente (%) y la relación solvente-semillas (X₄:1) mostraron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la extracción de los compuestos polifenólicos y la bixina presente en las semillas de annatto. En la Tabla 5 se muestra la variabilidad de los resultados obtenidos en cada unidad experimental, con resultados que varían de 0,53 a 4,36 mg GA/g de semillas para compuestos polifenólicos y de 0,03 a 0,58% para el caso de MAE y una variación para UAE entre 1,11 a 2,72 mg GA/g de semillas y de 0,17 a 0,67 % para compuestos polifenólicos y bixina, respectivamente. Esta variabilidad es confirmada por el ANOVA (Tabla 6), mostrando que la mayoría de las variables independientes estudiadas en su expresión lineal tuvieron una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el proceso de extracción de ambos compuestos y ambos tratamientos.

Las variables independientes como el tiempo de tratamiento y pH para el proceso de extracción de compuestos polifenólicos por UAE fueron las variables independientes en su expresión lineal que no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), pero si la presentaron en la interacción con las otras variables independientes. La influencia de estas condiciones en el proceso de extracción se debe principalmente a (i) el aumento en la capacidad de transferencia de masa y o el poder de extracción del sistema, (ii) la afinidad de los compuestos bioactivos hacia el solvente y (iii) al efecto del calor generado en los microdominios del sistema, que para el caso de MAE son generados por las ondas electromagnéticas de alta energía y para el caso de UAE son generados por la cavitación de pequeñas burbujas que generan el incremento de temperatura, presión y formación de microjets (17,122,123). Al aumentar la relación solvente-semilla (incrementando el solvente del medio), se favorece el incremento en el punto de saturación del sistema aumentando la movilidad de las semillas en el sistema agitado, para así incrementar la transferencia de masa de los compuestos bioactivos al solvente (122).

La relación solvente-semillas estudiada en el diseño experimental generó un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para la extracción de compuestos polifenólicos obtenidos por MAE y UAE y para la extracción de bixina por el método de UAE. Sin embargo, la relación solvente-semillas no presentó efecto estadísticamente significativo ($p > 0,05$) para la extracción de bixina por MAE. Este comportamiento es posible debido a la diferencia en la solubilidad de ambos biocompuestos y el principio del método de extracción. En el caso de los compuestos polifenólicos, al ser compuestos hidrofílicos y al incrementar el solvente tendría a aumentar su punto de saturación y así incrementar la cantidad de compuestos polifenólicos extraídos. Por otro lado, la bixina es un compuesto hidrofóbico, que se ve más influenciado por la concentración de etanol del solvente que por su proporción. Sin embargo, en el caso UAE

al producir la cavitación de las burbujas y generar micro-chorros en el sistema que colisionan con las semillas de annatto, se produce un efecto físico que favorece la separación de la resina externa de la semilla y que a su vez, favorece la separación de la bixina de la semilla. Por otra parte, la MAE no genera efectos físicos en su procesos de extracción, por ende allí rige más la capacidad de solubilizarían del compuesto a extraer en el sistema que incrementa su temperatura.

La cantidad de solvente en el sistema no solo afectó la capacidad de extracción del sistema, sino que también tuvo un efecto de interacción estadísticamente significativo con las otras variables independientes (Tabla 6), mejorando la afinidad de los compuestos hacia el solvente de extracción, lo que resultó en un incremento en el proceso de transferencia de masa de los compuestos bioactivos. Los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de annatto (es decir, apigenina, hipolaetina y el derivado de ácido caféico) poseen una polaridad mayor en comparación con la bixina, que es una molécula de cadena larga altamente conjugada, también conocida por tener una solubilidad muy baja. Por lo tanto, aumentar la concentración de etanol favorece la liberación de bixina al tener un mayor contenido de solvente para formar enlaces de hidrógeno, y en el caso de compuestos de polifenoles, la polaridad favorece la extracción (124–126).

Por otro lado, el efecto del pH no fue significativo en su término lineal para la extracción de los compuestos de polifenoles y la bixina en ambos tratamientos de extracción, lo cual puede ser causado por la baja solubilidad de la bixina a pH neutro y alcalino debido a su estructura altamente conjugada y a la presencia de un grupo terminal carboxilo. Mientras que, para el caso de los polifenólicos, al ser compuestos que poseen una estructura de anillo aromático que está unido a grupos hidroxilo u otros anillos planos presentan una solubilidad mayor a valores de pHs neutros y ligeramente ácidos (123). La poca significancia estadística del pH en el sistema puede atribuirse a los efectos de otras variables independientes estudiadas que eclipsaron su efecto.

Las gráficas de las superficies de respuesta obtenidas de los modelos polinómicos se muestran en la Figura 5. Todos los modelos fueron sometidos a un proceso de optimización. Las ecuaciones polinómicas para las variables de respuesta de ambos procesos se describen a continuación (Ecuaciones 13 y 14 para MAE y Ecuaciones 15 y 16 para UAE):

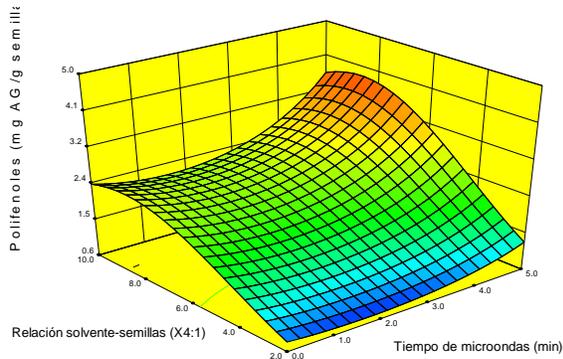
$$\text{Ln (polifenoles)} = 0.70 + 0.03 * X_2 - 0.26 * X_3 + 0.53 * X_4 + 0.26 * X_1 - 0.42 * X_2X_3 + 0.18 * X_2X_4 - 0.41 * X_4^2 + 0.29 * X_1^2 \quad (\text{Ec. 13})$$

$$\text{Ln (bixina)} = -0.59 - 1.12 * X_2 - 0.04 * X_3 + 0.76 * X_4 - 0.15 * X_1 + 0.04 * X_2X_4 - 0.01 * X_3X_4 + 0.06 * X_2^2 + 0.01 * X_4^2 + 0.10 * X_1^2 \quad (\text{Ec. 14})$$

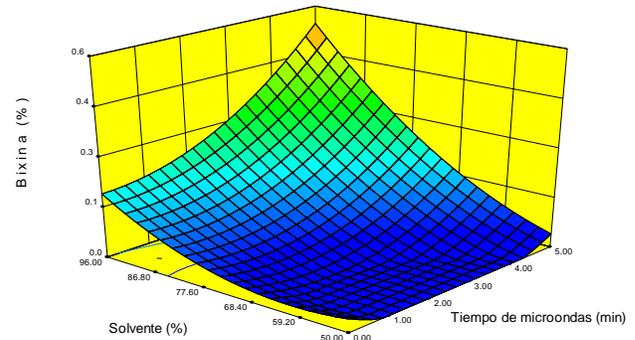
$$\text{Ln (bixina)} = -5.61 + 0.03 * X_2 + 0.07 * X_3 + 0.46 X_4 - 0.01 * X_1 - 0.01 * X_3 * X_4 + 0.01 * X_4 * X_1 \quad (\text{Ec. 15})$$

$$\text{Ln (polifenoles)} = -0.17 + 0.01 * X_3 + 0.03 * X_4 - 0.01 * X_1 + 0.01 * X_4 * X_1 \quad (\text{Ec. 16})$$

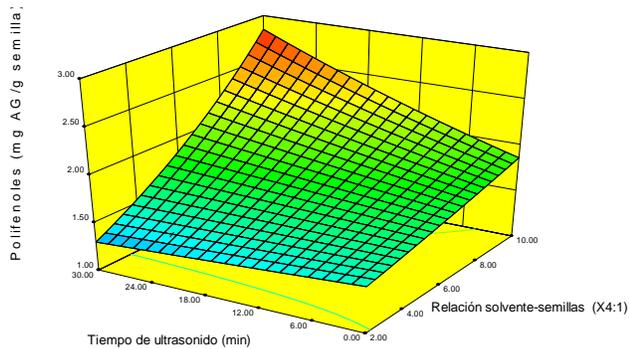
a.



b.



c.



d.

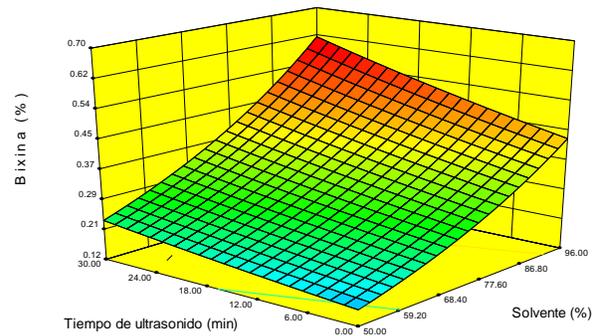


Figura 5. Gráficas de superficie de respuestas para los efectos significativos de: (a) relación solvente-semillas vs tiempo de MAE para el contenido de compuestos polifenólicos extraídos, (b) concentración del solvente vs tiempo de MAE para el rendimiento de bixina extraído, (c) relación solvente-semillas vs tiempo de UAE para el contenido de compuestos polifenólicos extraídos y (d) concentración del solvente vs tiempo de UAE para el rendimiento de bixina extraído.

El tiempo de tratamiento con microondas fue significativo ($p < 0,05$) ya que aumentó el poder de extracción para los compuestos polifenoles y la bixina. Sin embargo, los compuestos polifenoles fueron más sensibles a este proceso de extracción que la bixina (Figura 5a) ya que una vez que se alcanzó el punto máximo de extracción, el contenido de polifenoles disminuyó constantemente. Esto se explica por el calor generado durante el tratamiento con microondas. Por lo tanto, cuanto más largo sea el tratamiento, mayor será la temperatura alcanzada en el sistema, causando la volatilización del solvente junto con una degradación parcial de los compuestos polifenólicos.

Algunos autores han informado que la actividad biológica de estos metabolitos secundarios se ve afectada por el mecanismo de extracción y los tratamientos térmicos (11,127). Por otro lado, al igual que MAE, el tiempo de tratamiento de la UAE presentó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para la extracción de ambos compuestos. La importancia del tiempo de tratamiento de ultrasonido en el proceso de extracción se relaciona

con el tiempo de residencia de la cavitación de las burbujas que están en contacto con las semillas. Durante los primeros 15 minutos de tratamiento con ultrasonido, es posible que la transferencia de masa se produzca principalmente por convección y corresponda a la solubilidad del soluto extraído, mientras que a tiempos de ultrasonido por encima de los 15 min posiblemente haya fenómenos de difusión de los compuestos bioactivos hacia el solvente debido principalmente a la cavitación de las burbujas que incrementan la temperatura, la presión y la formación de micro-chorros, facilitando la liberación de los metabolitos que se encuentran en la parte interna de las semillas, y maximizando de esta manera la extracción de los compuestos (17,123).

En la Tabla 7 se encuentran los niveles de las variables independientes que maximizan la extracción de los compuestos bioactivos cuando se utilizan las técnicas MAE y UAE, junto con sus errores relativos y absolutos. El sesgo absoluto para el proceso de ambos métodos de extracción fue alto y por lo tanto, los resultados experimentales obtenidos fueron mayores que aquellos predichos por los modelos.

Tabla 7. Predicción de las condiciones optimizadas para la MAE y UAE aplicando un diseño experimental tipo Box-Behnken.

MAE						
Parámetro	pH	solvente (etanol) (%)	Solvente- semillas (X4:1)	Tratamiento (min)	Polifenoles (mg AG/g semilla)	Bixina (%)
Predicho	7,00	96	5,95	5,00	2,69	0,58
Experimental	7,00	96	5,95	5,00	3,08 ± 0,01	0,58 ± 0,02
		Error relativo			-0,39	0,00
		Error absoluto (%)			14,41	0,55
UAE						
Parámetro	pH	solvente (etanol) (%)	Solvente- semillas (X4:1)	Tratamiento (min)	Polifenoles (mg AG/g semilla)	Bixina (%)
Predicho	7,5	95,98	7,82	30,00	2,71	0,43
Experimental	7,0	96,00	7,00	30,00	3,81 ± 0,12	0,62 ± 0,03
		Error relativo			-1,10	-0,19
		Error absoluto (%)			40,74	44,42

Valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 3). MAE: extracción asistida por microondas, UAE: extracción asistida por ultrasonido, AG: ácido gálico.

Comparando los resultados del rendimiento de extracción para ambas técnicas reportados en la Tabla 6 se resalta que se necesita un tiempo de tratamiento más corto para MAE en comparación con los UAE para obtener aproximadamente el mismo rendimiento de extracción de los compuestos biológicamente activos de las semillas de annatto. Emine et al. obtuvieron resultados similares al comparar ambas técnicas de extracción para compuestos de polifenoles de ortiga (128). En este caso, utilizaron un tratamiento de 10 min a 407 W recuperando ácido gálico (1,125mg/g), ácido caféico (1,223mg/g), ácido clorogénico (4,798mg/g), ácido p-cumárico (1,157mg/g), naringenina (5,582 mg/g) y naringina (0,665mg/g). Estos compuestos fueron estadísticamente comparables a los obtenidos por los UAE a 80% de potencia y 30 min de tiempo de tratamiento (1,209, 1,289, 4,453, 1,100, 5,735, 0,784 mg/g, respectivamente). En las semillas de annatto, MAE muestra la misma eficiencia de extracción en un período de

tiempo más corto (128). La principal diferencia entre ambas técnicas se centra en la resistencia a la difusión para la transferencia de masa y calentamiento de compuestos bioactivos. Por lo tanto, los UAE generan micro-dominios y cavitaciones de las burbujas que causan una mayor rampa de temperatura, mientras que el MAE cambia la rotación molecular y la movilidad iónica del medio que genera calentamiento en todo el sistema y no en forma de micro-dominios.

6.1.2. Efecto de UAE y MAE sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto de semillas de annatto.

Las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los extractos obtenidos en las condiciones optimizadas para MAE y UAE se compararon con un extracto obtenido por extracción convencional. La Tabla 8 muestra una mayor actividad antimicrobiana y antioxidante para los UAE y MAE que la observada para el extracto obtenido por extracción convencional o lixiviación, entre unas 5 a 10 veces mayor. Esto se explica por el mayor contenido de compuestos polifenólicos y bixina obtenidos con ambos métodos de extracción emergentes.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) a diferentes pH contra *B. cereus* y *S. aureus* y actividad antioxidante de los extractos obtenidos por MAE, UAE y lixiviación.

Evaluación/Extracción		UAE	Lixiviación	MAE
<i>B. cereus</i>	pH 11 (mg/L)	37 ^a	48 ^b	16 ^c
	pH 7 (mg/L)	37 ^a	48 ^b	16 ^c
	pH 4 (mg/L)	37 ^a	48 ^b	16 ^c
<i>S. aureus</i>	pH 11 (mg/L)	9 ^a	48 ^b	8 ^a
	pH 7 (mg/L)	9 ^a	48 ^b	8 ^a
	pH 4 (mg/L)	9 ^a	48 ^b	8 ^a
Bixina	(%)	0,621 ^a ± 0,031	0,165 ^b ± 0,002	0,576 ^a ± 0,015
Polifenoles	mg AG/g semillas	3,814 ^a ± 0,201	0,343 ^b ± 0,003	3,078 ^a ± 0,012
ABTS	µM Trolox/L extracto	1035,652 ^a ± 189,5	174,782 ^b ± 8,700	577,68 ^c ± 5
FRAP	µM Trolox/L extracto	424,700 ^a ± 7,0	127,033 ^b ± 2,517	316,37 ^c ± 10
DPPH	µM Trolox/L extracto	1161,524 ^a ± 28,9	811,048 ^b ± 5,774	1043,90 ^c ± 50

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

El extracto de las semillas de annatto contiene principalmente compuestos de bixina y polifenoles que son responsables de las actividades antioxidantes y antimicrobianas (2). Particularmente, la bixina es una molécula altamente conjugada y los compuestos de polifenoles presentan grupos hidroxilo en su estructura que tienen la capacidad de capturar electrones, extinguiendo el oxígeno singlete, desactivando el estado de triplete excitado de los compuestos que son generalmente asociados con la fotosensibilización y barrido de radicales libres durante sus estados de transición. Como resultado, estos compuestos mostraron actividad antioxidante. Por otro lado, la actividad antimicrobiana se atribuye principalmente al contenido de compuestos polifenólicos en el extracto. Estos compuestos tienen la capacidad de desnaturalizar las proteínas de las membranas celulares microbianas y así generar su inactivación o muerte, sin verse afectados por el pH del medio (2). En consecuencia, las actividades antimicrobianas y antioxidantes in vitro aumentaron en los extractos obtenidos por

UAE y MAE debido a la mayor cantidad de compuestos bioactivos en comparación con el extracto obtenido por lixiviación. Sin embargo, no se apreció una asociación proporcional directa entre el aumento de los compuestos bioactivos y los incrementos de las actividades antimicrobianas y antioxidantes del extracto obtenido por MAE. Por lo tanto, la actividad antioxidante fue la variable más afectada por el método de extracción. Estos resultados concuerdan con los reportados por Zhang et al. (2010) y Yolmeh et al. (2014) cuando se utilizaron los UAE para la extracción de astaxantina y bixina respectivamente, mostrando una mayor capacidad antioxidante (11,127).

6.2. Extracción asistida por ultrasonido de proteínas vegetales y caracterización de propiedades fisicoquímicas y funcionales (Anexo 3).

6.2.1. Composición química del material vegetal.

La composición química de las tres fuentes vegetales estudiadas fueron: (i) humedad (%) $8,91 \pm 0,39$, $5,77 \pm 0,11$ y $6,30 \pm 0,49$; (ii) cenizas (%) $4,81 \pm 0,39$, $6,10 \pm 0,38$ y $3,52 \pm 0,28$; (iii) proteína cruda (%) $16,17 \pm 0,25$, $22,97 \pm 0,12$ y $22,10 \pm 0,35$; (iv) extracto etéreo (%) $0,05 \pm 0,05$, $0,14 \pm 0,08$ y $0,12 \pm 0,10$ y (v) carbohidratos (%) $70,06 \pm 0,16$, $60,22 \pm 0,37$ y $67,96 \pm 0,48\%$ para quinua, lentejas y frijol negro, respectivamente. Estas fuentes vegetales fueron abundantes principalmente en el contenido de carbohidratos y proteína, con un contenido de proteína en base seca de 16,25%, 23,02% y 22,16% para quinua, lentejas y frijol negro, respectivamente. Estos contenidos de proteínas están acordes con previos estudios, donde reportan contenidos de proteína de $14,03 \pm 0,25\%$ y $23,04 \pm 0,25\%$ para quinua y frijol negro, respectivamente (129,130). De forma particular, el contenido de proteína de las lentejas es mayor que los reportados por otros investigadores ($15,3 \pm 0,1\%$) (131). Este fenómeno puede ser explicado por factores estacionales como la composición del suelo, tiempo de cosecha, siembra, variedad y condiciones ambientales. Vale la pena mencionar el alto potencial nutricional de estos polvos como una buena fuente de proteína en comparación con otras plantas como el arroz (7,5%), el maíz (13,4%) y la cebada (11%) (129).

6.2.2. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de proteína (UAEP).

La Tabla 9 enumera la matriz experimental y el rendimiento proteico obtenido de cada fuente. Cada matriz contó con 17 corridas experimentales y cada experimento se realizó por triplicado.

Tabla 9. Matriz experimental para la UAPE de quinua, lentejas y frijoles negros según el diseño experimental Box-Behnken

pH	Ultrasonido (min)	Relación buffer-harina vegetal (X:1)	Quinua	Lentejas	Frijol negro
			Proteína (%)	Proteína (%)	Proteína (%)
6,0	10,0	5,0	$2,23 \pm 0,01$	$6,87 \pm 0,03$	$10,18 \pm 0,05$
8,0	0,0	15,0	$1,71 \pm 0,22$	$8,57 \pm 0,02$	$9,27 \pm 0,02$
6,0	0,0	10,0	$2,81 \pm 0,05$	$10,15 \pm 0,04$	$6,77 \pm 0,08$
8,0	20,0	15,0	$3,09 \pm 0,11$	$10,33 \pm 0,04$	$8,94 \pm 0,03$
6,0	10,0	15,0	$2,54 \pm 0,14$	$9,07 \pm 0,03$	$8,12 \pm 0,03$
10,0	10,0	5,0	$3,70 \pm 0,07$	$6,83 \pm 0,02$	$9,56 \pm 0,03$

8,0	10,0	10,0	3,12 ± 0,05	7,26 ± 0,03	8,82 ± 0,05
10,0	0,0	10,0	2,78 ± 0,09	7,75 ± 0,04	8,87 ± 0,03
8,0	10,0	10,0	3,48 ± 0,14	7,59 ± 0,02	7,83 ± 0,03
6,0	20,0	10,0	3,77 ± 0,05	8,16 ± 0,02	9,68 ± 0,04
10,0	10,0	15,0	2,95 ± 0,12	9,29 ± 0,02	8,52 ± 0,02
10,0	20,0	10,0	3,70 ± 0,07	8,60 ± 0,01	8,73 ± 0,07
8,0	10,0	10,0	2,93 ± 0,07	7,47 ± 0,03	8,37 ± 0,04
8,0	20,0	5,0	4,54 ± 0,05	6,78 ± 0,02	10,32 ± 0,04
8,0	10,0	10,0	3,12 ± 0,05	7,48 ± 0,02	7,55 ± 0,06
8,0	10,0	10,0	3,12 ± 0,07	7,38 ± 0,01	7,60 ± 0,01
8,0	0,0	5,0	3,48 ± 0,03	6,71 ± 0,04	10,26 ± 0,05

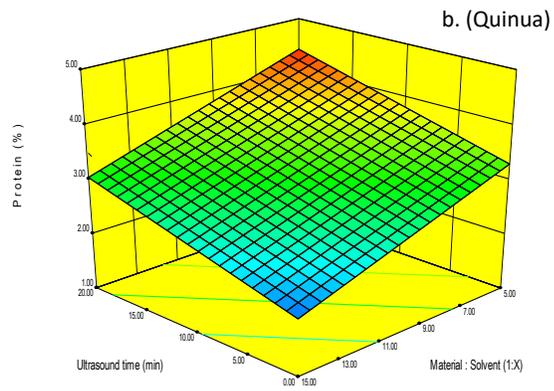
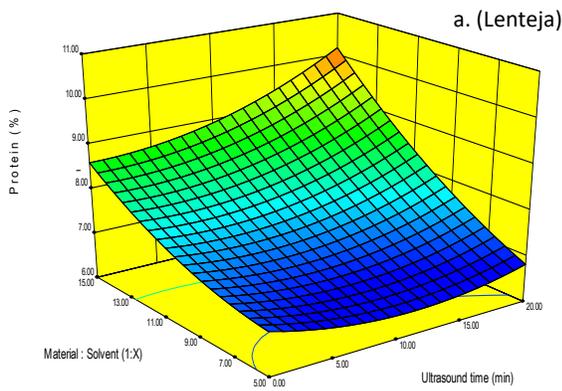
Valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 3).

Las condiciones experimentales de extracción afectaron la cantidad de proteína obtenida de las tres fuentes. El mayor rendimiento de extracción se obtuvo a pH 8 y un tratamiento de ultrasonido de 20 min. Un pH ligeramente alcalino fue el factor más crítico para la extracción de proteínas, ya que garantizó un alto rendimiento de extracción. Además, este pH aumentó la solubilidad, pero a su vez contribuyó a la desnaturalización parcial de las proteínas. Mientras que, a un pH ácido las proteínas se acercan a su punto isoeléctrico, disminuyendo su solubilidad y, por lo tanto, disminuyendo el proceso de transferencia de masa. Los tipos de fuente vegetal, solvente y el pH del buffer también afectaron el rendimiento de la proteína. Por otro lado, los tratamientos de ultrasonido prolongados condujeron a una mayor transferencia en los procesos de extracción de proteínas, en todas las fuentes estudiadas. Este aumento se atribuye al efecto generado por la cavitación en el tampón de extracción, generando microchorros que impactan el material vegetal y los diferenciales de temperatura y presión que favorecen la migración de proteínas del material vegetal al buffer (132). Otros estudios también han demostrado que el ultrasonido aumentó la eficiencia de extracción (del 37 al 57%) de proteínas de otras fuentes, como el germen de trigo (133). Por lo tanto, la intensa cavitación y el efecto mecánico causado por los ultrasonidos son responsable de la mejora de la extracción de proteínas. Como resultado, las partículas se descomponen en partículas más pequeñas creando una mayor superficie disponible para la toma del medio, lo que mejora el proceso de transferencia de masa (133).

La Tabla ANOVA para el rendimiento proteico (Figura 6) muestra que la mayoría de los modelos cuadráticos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) y mostraron un excelente ajuste a los datos experimentales, tal y como lo indica el alto coeficiente de correlación (121). Además, las gráficas de superficie de respuesta muestran que el aumento del tiempo de ultrasonido conduce a un aumento en el rendimiento de la extracción de las proteínas. Este efecto fue más llamativo para las proteínas de quinua. Las tres variables independientes estudiadas en cada diseño fueron estadísticamente significativas en su interacción lineal y términos cuadráticos.

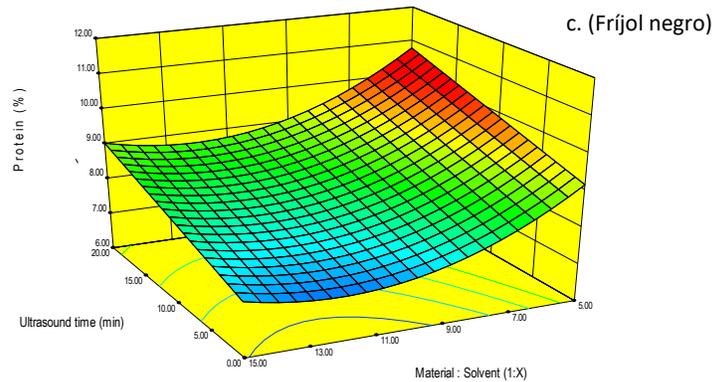
Variable	Quinoa (%)	Lentejas (%)	Fríjol negro (%)
	Valor p	Valor p	Valor p
Modelo	< 0,001	< 0,001	0,002
A-pH	> 0,050	0,028	0,560
B- Ultrasonido (min)	< 0,001	< 0,001	0,044
C- Relación buffer-harina vegetal (X:1)	< 0,001	< 0,001	0,002
AB	> 0,050	> 0,050	0,019
BC	> 0,050	0,001	> 0,050
A ²	> 0,050	0,012	> 0,050
B ²	> 0,050	0,001	> 0,050
C ²	> 0,050	0,001	0,006
Carencia de ajuste	0,549	0,139	0,527
r ²	0,911	0,992	0,82
r ² -ajustado	0,897	0,985	0,731

B



$$\begin{aligned}
 \text{Lenteja (\%)} = & 9,92 - 0,78*A - 0,13*B - 0,08*C \\
 & + 8,32 \times 10^{-3} * BC + 0,05 * A^2 + 3,93 \times 10^{-3} * B^2 + 0,01 * C^2
 \end{aligned}
 \quad (\text{Ec. 17})$$

$$\text{Quinoa (\%)} = 4,01 + 0,06*B - 0,13*C \quad (\text{Ec. 18})$$



$$\text{Frijol negro (\%)} = 9,89 + 0,44*A + 0,35*B - 0,95*C - 0,04*AB + 0,04*C^2 \text{ (Ec. 19)}$$

Figura 6. (Panel A) Tabla ANOVA para el rendimiento de proteínas de cada fuente. (Panel B) Gráficos de superficie de respuesta para los efectos de la relación de tampón a material frente al tiempo de ultrasonido sobre el rendimiento de proteínas de: (a) lentejas, (b) quinua y (c) frijól negro.

El proceso de optimización se llevó a cabo sobre la base de los modelos cuadráticos obtenidos (Ecuaciones 17, 18 y 19) con el fin de maximizar el rendimiento proteico de cada fuente vegetal. Los valores óptimos previstos por los modelos fueron por un lado un tiempo de tratamiento de 20 min, pH de 9 y una relación buffer-material de 5:1 para quinua y frijól negro; mientras que para las lentejas fue necesario una proporción de 10:1. El rendimiento proteico previsto en estas condiciones fue del 4,42%, 9,55% y 10,32% para la quinua, la lenteja y los frijoles negros, respectivamente. Se llevaron a cabo tres corridas de validación experimental en estas condiciones óptimas, lo que dio como resultado rendimientos proteicos de $4,10 \pm 0,18$, $7,64 \pm 0,03$ y $9,70 \pm 0,10$ para la quinua, la lenteja y los frijoles negros, respectivamente, con errores relativos y absolutos de 7,22 %, 20,02 % y 6,01 % para la quinua, la lenteja y el frijól negro, respectivamente. Estas condiciones óptimas de extracción se emplearon para la extracción de proteínas que posteriormente fueron evaluadas y caracterizadas por su funcionalidad.

6.2.3. Contenido de aminoácidos (AA) de las proteínas extraídas.

Las proteínas extraídas de las tres fuentes vegetales se componen principalmente de un grupo de cinco aminoácidos (ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, glicina y arginina), los cuales oscilan entre el 50 y el 55% en total (Figura 7) y son aminoácidos ionizados en pH neutro.

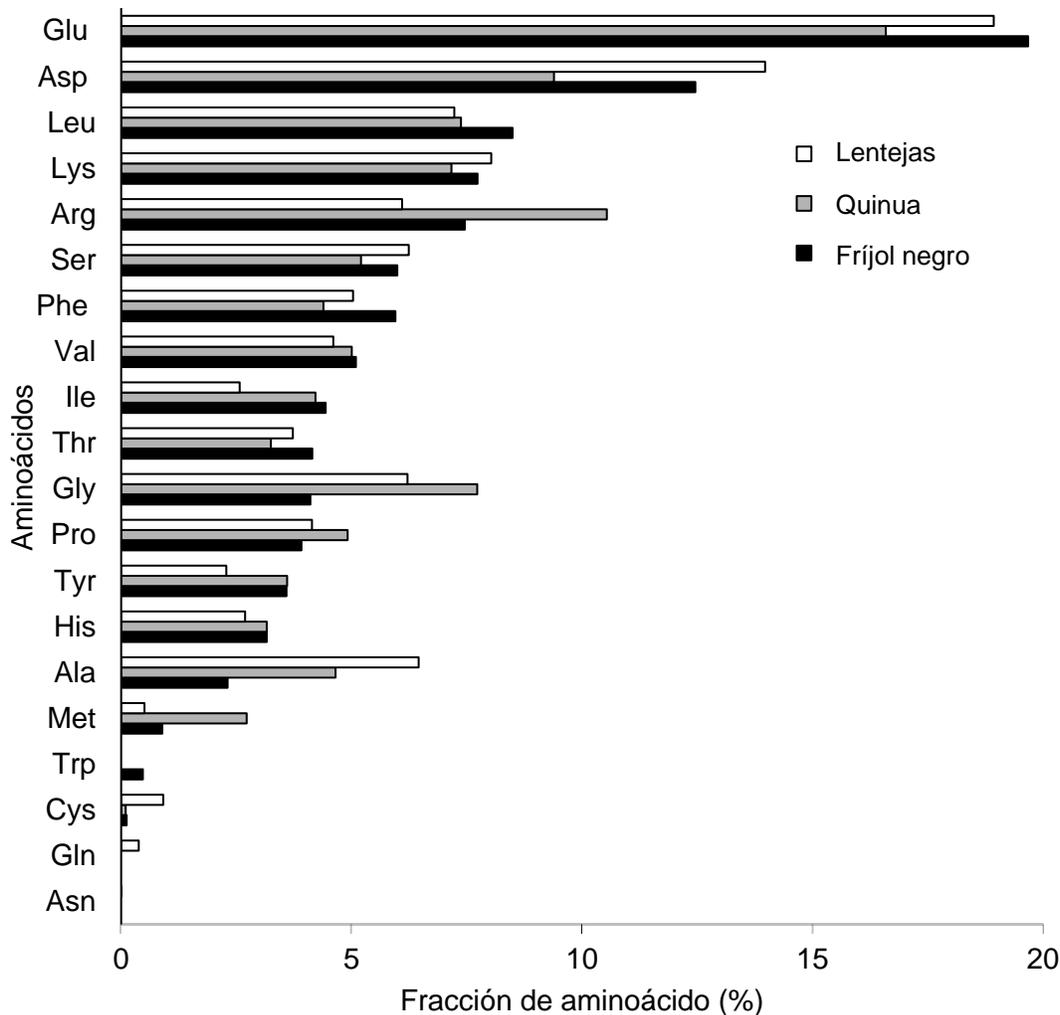


Figura 7. Composición de aminoácidos de las proteínas de quinua, fríjol negro y lentejas (g/100 g de aislado de proteína).

Estos resultados concuerdan con otros informes sobre proteínas extraídas de fuentes vegetales como la soja, el girasol y la patata (68,134), los cuales contenían principalmente los aminoácidos arginina, glutámico y aspártico (54,134). Es bien sabido que los grupos radicales que se encuentran en la estructura proteica y las regiones ionizadas junto con las regiones hidrófobas e hidrófilas son las responsables de algunas de las propiedades funcionales de las proteínas tales como las capacidades de estabilización de emulsiones, de gelificación y de formación de espuma (54,134). Por otra parte, los aminoácidos ionizados como Glu, Asp, Arg, Lys y His contienen grupos iónicos capaces de formar interacciones electrostáticas y estéricas, y por lo tanto, contribuyen a la estabilidad de partículas de los sistemas emulsionados y gelificados. Por otro lado, Cys y Met son aminoácidos que contienen azufre y grupos SH que

son capaces de formar geles como consecuencia de la desnaturalización de proteínas (81,82,135). Por lo tanto, se espera una notable actividad gelificante y emulsionante de las proteínas obtenidas a partir de lentejas, fríjoles negros y quinua.

6.2.4. Caracterización de las proteínas obtenidas por UAPE y PE optimizados.

Las propiedades y características funcionales de las proteínas obtenidas por UAPE y PE se muestran en la Tabla 10. El tipo de extracción y la fuente de proteínas fueron las variables independientes que afectaron los parámetros estudiados. Además, propiedades como MW, IP y SH son propiedades muy relacionadas con la fuente vegetal. Por el contrario, propiedades como EY, WHC, FAC, EAI, ESI y Tgel dependen de ambas variables, de la fuente vegetal y del tratamiento de extracción aplicado.

Tabla 10. Caracterización de proteínas de quinua, fríjol negro y lentejas obtenidas por UAPE y PE optimizados.

Fuente	Quinua		Fríjol negro		Lentejas	
	PE	UAPE	PE	UAPE	PE	UAPE
EY (%)	16,24 ^a ± 0,02	39,34 ^b ± 0,01	31,61 ^a ± 0,01	67,71 ^b ± 0,01	23,19 ^a ± 0,01	57,57 ^b ± 0,06
MW (kDa)	58 and 46 to 32	58 and 46 to 32	46 to 32	46 to 32	80 to 32	80 to 32
pl	4,00 ^a ± 1,00	5,00 ^a ± 1,00	3,50 ^a ± 1,00	3,50 ^a ± 1,00	4,00 ^a ± 1,00	5,00 ^a ± 1,00
SH (µM SH / g)	11,48 ^a ± 0,24	11,93 ^a ± 0,45	18,13 ^a ± 1,09	19,16 ^a ± 0,477	21,03 ^a ± 0,38	21,12 ^a ± 0,27
WHC (%)	86,84 ^a ± 3,69	116,55 ^b ± 8,70	64,14 ^a ± 15,71	254,02 ^b ± 4,44	154,42 ^a ± 21,73	182,09 ^b ± 3,56
FAC (%)	222,96 ^a ± 11,91	241,10 ^b ± 12,56	242,25 ^a ± 20,78	241,77 ^a ± 18,47	176,65 ^a ± 4,28	229,79 ^b ± 7,12
EAI (m²/g)	16,08 ^a ± 0,26	18,53 ^b ± 0,48	10,41 ^a ± 0,22	11,81 ^b ± 0,13	46,26 ^a ± 2,76	51,05 ^b ± 18,38
ESI (min)	17,29 ^a ± 0,27	16,66 ^a ± 0,79	15,34 ^a ± 2,60	14,08 ^a ± 0,12	11,10 ^a ± 0,14	29,22 ^b ± 1,11
Tgel (°C)	58,75 ^a ± 1,00	60,61 ^b ± 1,00	78,97 ^a ± 1,00	75,42 ^b ± 1,00	66,13 ^a ± 1,00	62,39 ^b ± 1,00

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3); EY: Rendimiento de extracción, MW: peso molecular, pl: punto isoeléctrico, SH: grupos tiol, WHC: capacidad de retención de agua, FAC: Capacidad de absorción de grasa, EAI: índice de actividad emulsionante, ESI: índice de estabilidad emulsionante, Tgel: Temperatura de gelificación. PE: Extracción sin ultrasonido, y UAPE: extracción asistida por ultrasonido

En general, se alcanzó un aumento de dos veces en el rendimiento de proteínas cuando se empleó el ultrasonido comparado con el proceso de extracción de proteínas por lixiviación. El efecto de cavitación explica esto en la extracción asistida por ultrasonido que generó los micro-chorros y los diferenciales de temperatura y presión, lo que favoreció la transferencia de proteínas del polvo de la planta a la fase tampón. Además, los resultados obtenidos para las extracciones de PE de las tres fuentes fueron comparables a los obtenidos por otros autores (104,116,136–139).

Curiosamente, el tipo de extracción no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en propiedades como MW, pl, SH, PS (excepto la quinua) y ESI (excepto las lentejas) para las tres fuentes de proteínas. El MW, pl, SH, PS son propiedades relacionadas con la estructura primaria de la proteína, y sus valores no se ven afectados por la aplicación de ultrasonido en los procesos de extracción (Figura 8 y Tabla 9). Por otro lado, el ultrasonido mostró efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) para las propiedades funcionales evaluadas; WHC, FAC, EAI, ESI y Tgel que están relacionados con la estructura secundaria de la proteína (Tabla 9 y Figura 9).

Los micro-chorros generados en la extracción asistida por ultrasonido chocan con las proteínas suspendidas en el medio (140,141). Este efecto físico en los procesos de extracción genera una desnaturalización parcial de las proteínas, generando un despliegue de la estructura secundaria y exponiendo los grupos radicales internos de la proteína para aumentar las interacciones hidrofóbicas, de puente H, electrostáticas y disulfuro. Esto explica los cambios entre UAPE y PE en las propiedades funcionales. Sin embargo, este efecto de los micro-chorros sobre la estructura de la proteína no logra la ruptura de los enlaces covalentes y peptídicos; por lo tanto, el uso de ultrasonido en los procesos de extracción no afecta las propiedades relacionadas con la estructura primaria de las proteínas (142).

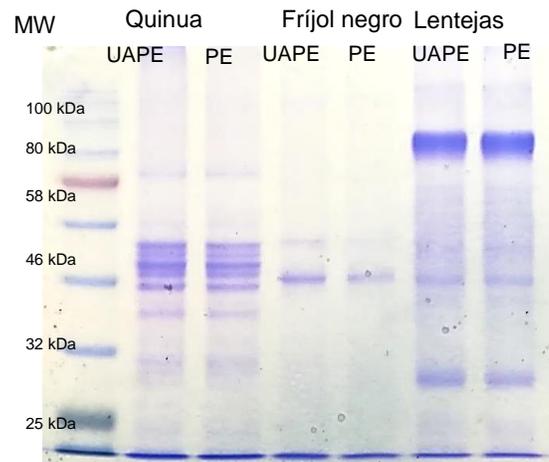


Figura 8. SDS-PAGE de proteínas de quinua, frijoles negros y lentejas con UAPE y sin tratamiento por ultrasonido (PE). MW: peso molecular.

Estos resultados son comparables con otros informes (132). Zhut y col. en 2018 evaluó el impacto del ultrasonido en las propiedades moleculares, fisicoquímicas y funcionales del aislado de proteína de nuez (132). Mediante una espectroscopía de dicroísmo circular se detectó una disminución en la hélice α y un aumento en el contenido de la lámina β , el giro β y la espiral aleatoria en la estructura secundaria de la proteína de nuez. Estos cambios en la estructura secundaria de proteínas justificaron el aumento de la solubilidad en agua (+ 22%), el índice de actividad emulsionante (+ 26%) y el índice de estabilidad emulsionante (+ 41%) de las proteínas de nuez después del ultrasonido (132). Además, el ultrasonido utilizado no afectó las propiedades relacionadas con la estructura primaria de la proteína, como el peso molecular. Estos resultados sugieren que el ultrasonido es una herramienta valiosa para mejorar los atributos funcionales de las proteínas que están relacionadas con la estructura secundaria de la proteína.

La Figura 9 muestra la progresión de las propiedades visco-elásticas (G' , módulo de almacenamiento) a un nivel de proteína del 5% durante la formación del gel para las tres fuentes vegetales diferentes obtenidas por PE y AUPE. Este gráfico representa la capacidad de las proteínas para formar una estructura de red adecuada tras el tratamiento térmico. El comportamiento del módulo de almacenamiento en los tres aislados de proteínas fue constante hasta una temperatura de calentamiento de aproximadamente 50 ° C. Una vez que se ha excedido esta temperatura, se aumenta la movilidad de la estructura de la proteína debido a la agitación térmica, promoviendo la formación de una red de gel. Esta transición de fase se produjo debido a la formación de enlaces disulfuro e interacciones electrostáticas entre los restos expuestos (111).

Los perfiles de gelificación obtenidos para estas proteínas son similares a los encontrados por los productos proteicos. Sin embargo, los ultrasonidos generaron un aumento en el módulo de almacenamiento de las proteínas y generaron marcadas diferencias en la gelificación. Este efecto se explica por la desnaturalización previa causada por el ultrasonido en las proteínas, desplegando la estructura de las proteínas para inducir nuevas interacciones electrostáticas, que se reflejan en la formación de una nueva red de gel, como se ve por el aumento del módulo de almacenamiento (111). Por lo tanto, el ultrasonido genera una modificación estructural de las proteínas, que cambia el proceso de formación de gelificación y, por lo tanto, la capacidad emulsionante y la capacidad de sorción de agua como se enumera en la Tabla 10.

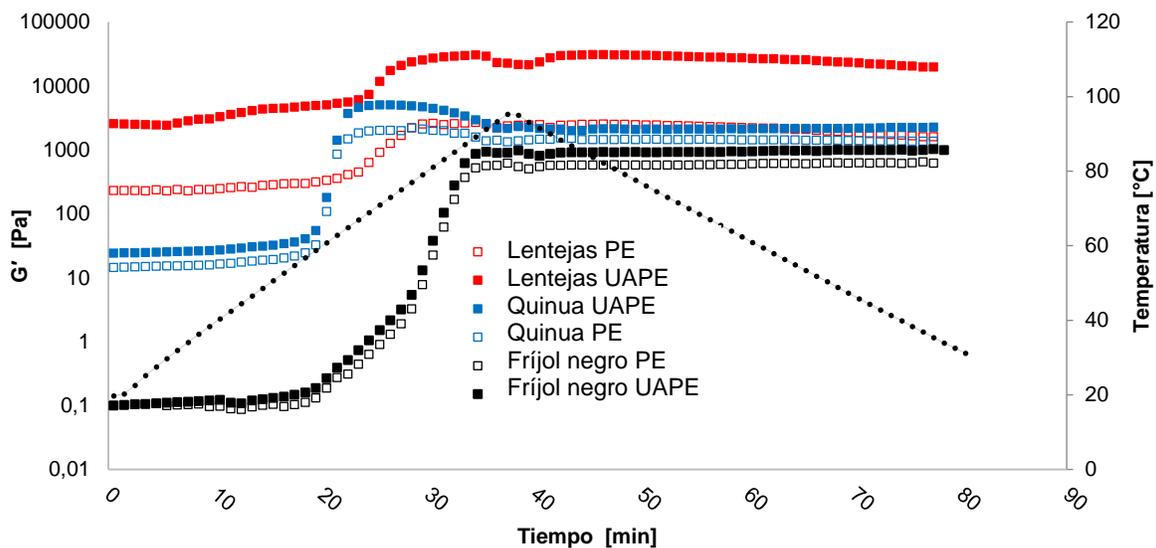


Figura 9. Variación del módulo de almacenamiento (G') con el tiempo en una prueba de rampa de temperatura de proteínas de quinua (azul), frijol negro (negro) y lenteja (rojo) obtenidas por UAPE (cuadro relleno): proteínas extraídas con ultrasonido y PE (cuadro vacío): proteínas extraídas sin ultrasonido.

6.2.5. Análisis multivariado de las propiedades funcionales de las proteínas extraídas.

Las propiedades funcionales globales de las proteínas extraídas de la quinua, las lentejas y los frijoles negros se representan en la gráfica de componentes principales de la Figura 10. El análisis de componentes principales determinó que los primeros tres componentes describen el 85.3% de la variabilidad entre los datos. Este gráfico muestra tres grupos principales para todas las propiedades estudiadas. Un grupo está compuesto por la fuente de proteína que se asoció principalmente a los grupos SH, la temperatura de gelificación y la capacidad de absorción de agua. Esto indica que las proteínas aisladas de lentejas tenían una actividad principal de gelificación y adsorción de agua en comparación con las proteínas de quinua. El segundo grupo se caracteriza por el tratamiento de extracción (PE o UAPE), rendimiento de proteínas, adsorción de aceite y en un peso molecular de grado muy inferior.

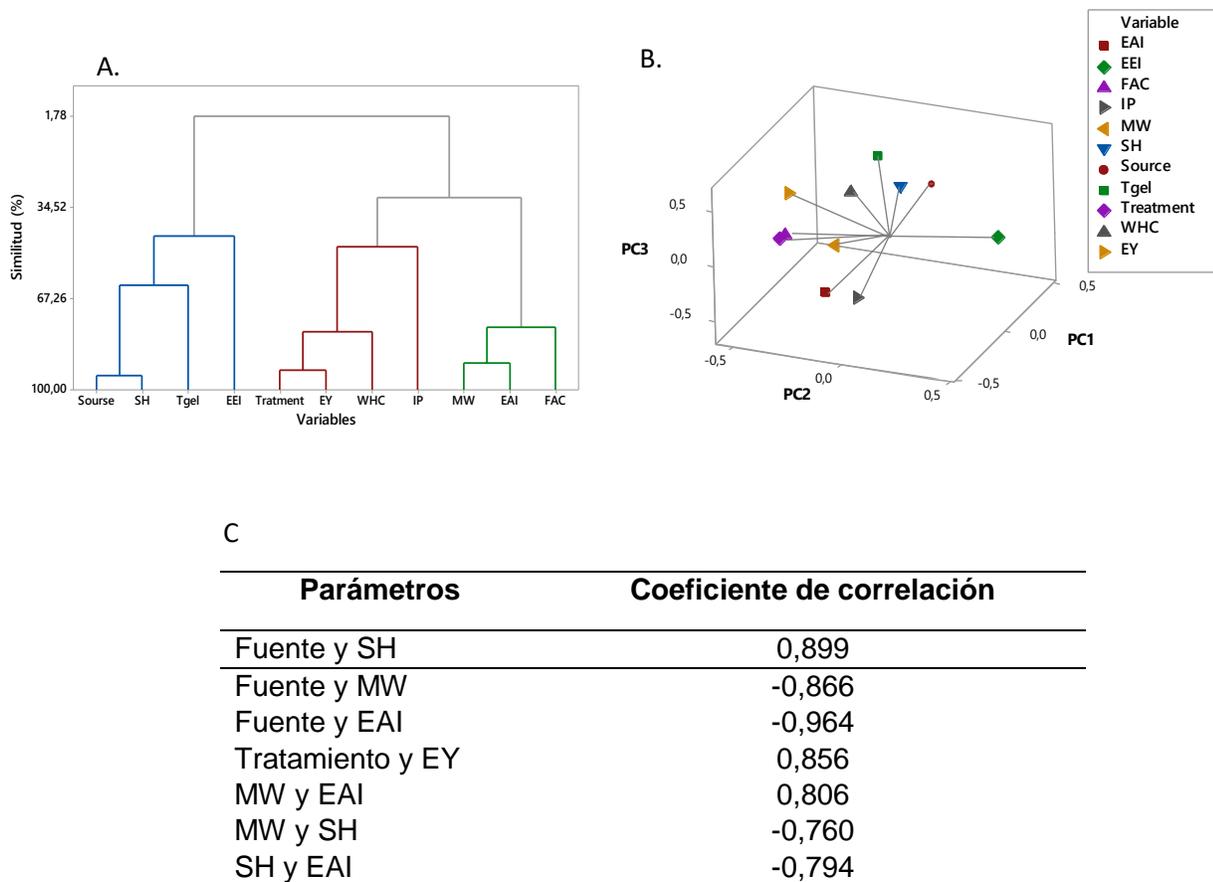


Figura 10. Análisis multivariado para el proceso de extracción y caracterización de quinua, frijol negro y proteínas de lentejas: (A) dendrograma, (B) bigráfico de PCA y (C) Variables con correlación significativa. EY: Rendimiento de extracción, MW: peso molecular, IP: punto isoeléctrico, SH: grupos tiol, WHC: capacidad de retención de agua, FAC: Capacidad de absorción de grasa, EAI: índice de actividad emulsionante, ESI: índice de estabilidad emulsionante, Tgel: Temperatura de gelificación.

Por lo tanto, el ultrasonido en medios alcalinos desnaturaliza la proteína exponiendo restos hidrofóbicos aumentando la adsorción de aceite. Por el contrario, el tercer grupo muestra el

punto isoeléctrico de la proteína fuertemente relacionado con la capacidad emulsionante. De hecho, las proteínas de las lentejas mostraron el mayor punto isoeléctrico y, por lo tanto, la mayor actividad emulsionante. Esta actividad está relacionada con la capacidad de absorber y dispersar aceites. Además, el peso molecular influye en la velocidad a la que la molécula se adsorbe en la interfaz aceite/agua y, por lo tanto, en cuanto más pequeña es la molécula, mayor es la velocidad de absorción, lo que da como resultado una emulsión estable, como ocurrió con las proteínas extraídas de las lentejas. El análisis de correlación confirmó los resultados obtenidos por el PCA. De hecho, las proteínas aisladas de lentejas mostraron el mayor contenido de aminoácidos azufrados (ejem, cisteína y metionina), el peso molecular más bajo y la mayor actividad emulsionante. Además, el ultrasonido en medio alcalino implicaba una mayor solubilidad de proteínas y, por lo tanto, una mayor extracción de proteínas. Además, un alto peso molecular de la proteína se reflejó en una menor capacidad emulsionante.

6.3. Estandarización del proceso de encapsulación por gelación iónica con proteínas vegetales como material de recubrimiento (Anexo 4).

6.3.1. Estudio reológico como herramienta de estandarización de condiciones de concentración, pH, temperatura de gelación y presencia de iones Ca^{2+} .

6.3.1.1. Efecto de la concentración de proteína y el tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones proteicas

Para determinar el efecto de la concentración de proteínas extraídas por UAPE en las propiedades reológicas de las soluciones de proteína de quinua, fríjol negro y lentejas se realizaron curvas de flujo, barridos de frecuencia y barridos de temperatura. Además, se realizaron curvas de flujo y barridos de frecuencia antes y después de cada tratamiento térmico (80°C durante 5min) para identificar los cambios reológicos. La Figuras 11 muestra los resultados obtenidos para los parámetros del comportamiento de flujo (n), índice de consistencia (K), el módulos de almacenamiento (G') y el ángulo de desfase (δ) para las soluciones de proteínas de las tres fuentes vegetales a diferentes porcentajes de concentración.

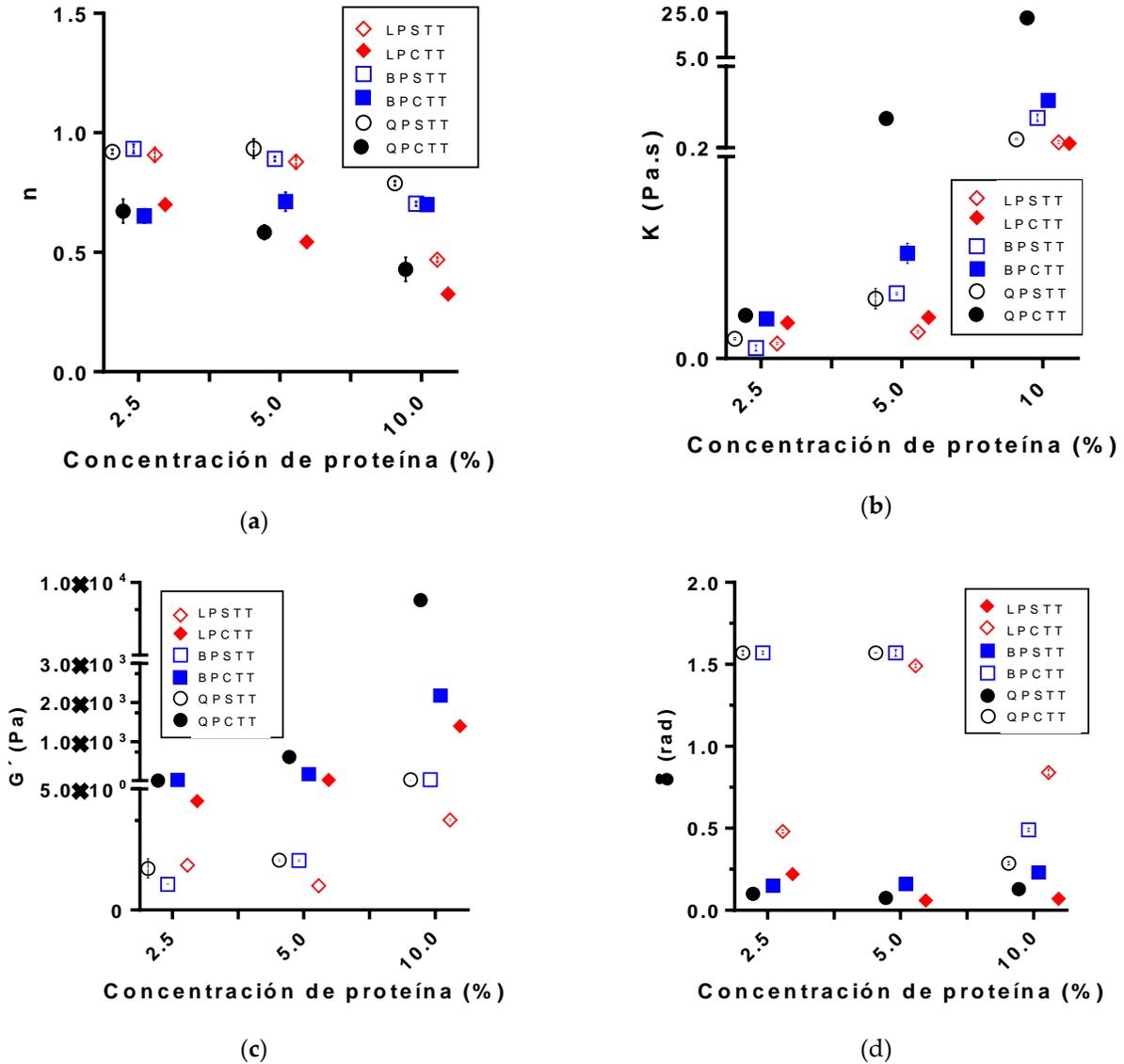


Figura 11. Efecto de la concentración de proteína y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijón negro (BP) y lentejas (LP) con tratamiento térmico (CTT) y sin tratamiento térmico (STT). (a) promedio del comportamiento de flujo (n); (b) promedio del índice de consistencia (K); (c) promedio del módulo de almacenamiento (G') de los barridos de frecuencia; (d) promedio del ángulo de desfase (δ) de los barridos de frecuencia.

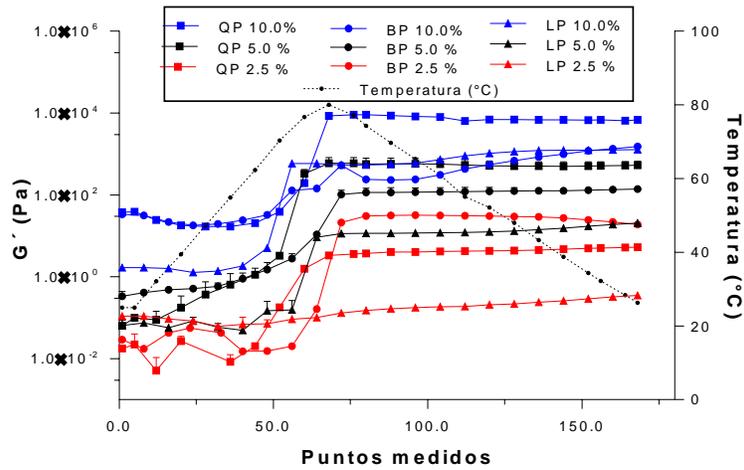
El índice del comportamiento del flujo (n) obtenido para las soluciones proteicas (Figura 11a) demostró un comportamiento pseudoplástico ($n < 1$) para todas las soluciones independiente de la fuente de proteína, la concentración evaluada y el tratamiento térmico (TT). Sin embargo, al incrementar la concentración de la proteína sin haberles aplicado el tratamiento térmico, el valor para n disminuyó, incrementando el comportamiento pseudoplástico de las soluciones proteicas. De igual forma, para la mayoría de los casos, el TT disminuyó el valor de n con tratamiento térmico (CTT) comparado con su valor n sin

tratamiento térmico (STT), la excepción en el comportamiento se dio en la solución de proteínas de frijol negro a una concentración del 10%, para la cual, el valor n obtenido STT presento un valor promedio muy cercano al obtenido para la misma solución CTT.

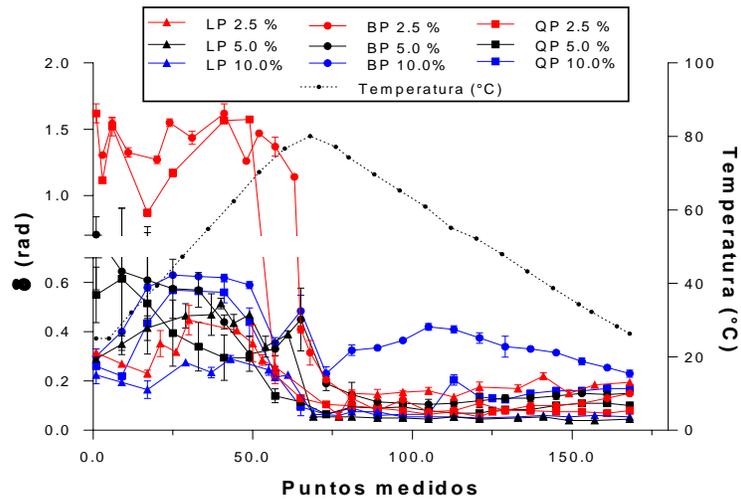
El efecto de la concentración y el TT sobre el índice de consistencia (K) de las soluciones proteicas (Figura 11b) respalda el efecto generado sobre n . Al incrementar la concentración de las soluciones STT y al realizarle el TT, K incrementó para cada solución, el cual expresa el esfuerzo necesario para hacer fluir la solución; por lo tanto, entre mayor sea K , la solución es más viscosa o elástica, siendo un fluido pseudoplástico mas viscoso que uno newtoniano.

Las Figuras 11c y 11d muestran los resultados promedios del módulo de almacenamiento (G') y del ángulo de desfase (δ) obtenidos en los barridos de frecuencia para las soluciones de los aislados proteicos de las tres fuentes vegetales a diferentes concentraciones. El G' para las soluciones incremento a medida que se aumentaba la concentración de proteínas. A su vez, δ disminuyó a medida que aumentaba la concentración. El δ cuantifica la relación $G':G''$ e indica la relación entre la energía disipada y almacenada del material. A medida que δ disminuye, el comportamiento de la muestra pasó de ser una solución diluida ($\delta > 1.2$ rad) a ser un líquido viscoso ($1.2 > \delta > 0.7$ rad) hasta presentar una estructura de tipo gel ($\delta < 0.7$ rad) (143). Al incrementar la concentración de proteínas en la solución, se pasó de un líquido viscoso a una estructura tipo gel, entre menor será δ la estructura gel presenta mayor resistencia a la cizalla. Al aplicar el TT en las soluciones proteicas, indiferente a la concentración evaluada y a la fuente, tanto G' como δ cambiaron significativamente; incrementando para G' y disminuyendo para δ . Este primero, presento un incremento en las soluciones CTT dependiendo de la concentración, un mayor incremento directamente proporcional a la concentración; reportando un mayor G' para las proteínas aisladas de quinua, luego las aisladas de frijol negro y por ultimo las aisladas de lentejas (Figura 11c).

Sin embargo, a pesar que δ también presento una mayor disminución para las soluciones CTT de mayor concentración, el menor valor de δ obtenido fue para las proteínas de lentejas, seguida de las de quinua y por ultimo las de frijol (Figura 11d). El comportamiento descrito previamente para los parámetros de G' y δ debido al efecto del TT, se observan más detallados en el barrido de temperatura reportado en las Figura 12.



(a)



(b)

Figura 12. Efecto de la concentración de proteína y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijol negro (BP) y lentejas (LP). (a) módulo de almacenamiento (G') obtenido en el barrido de temperatura; (b) ángulo de desfase (δ) obtenido en el barrido de temperatura.

La modificación de los parámetros reológicos atribuidos al incremento de la concentración de las soluciones de proteínas STT es atribuido las interacciones electrostáticas y el entrelazamiento molecular entre proteínas por el aumento de la densidad de las macromoléculas en la solución (144). A mayor sea la concentración de las moléculas en la solución, mayor será la resistencia a la cizalla o movimiento de la solución, lo que se ve expresado en el incremento de la viscosidad, G' , K y disminución de n y δ . Estos resultados son consistentes con los reportados por Chu L. et al. en 2019, y Bingnan et al. en 2019 que establecieron que al aumentar el número de moléculas de proteína de soja en solución, las

macromoléculas están lo suficientemente cerca como para enredarse aumentando su sólido comportamiento elástico (143,144). Este comportamiento no fue consistente en soluciones de proteína de lentejas al 10,0%, donde sin tratamiento térmico mostraron valores de G' cercanos a las muestras concentradas 5,0%. Este fenómeno podría atribuirse al bajo peso molecular de las proteínas de lentejas (Tabla 9) en comparación con el de las otras dos fuentes. Por lo tanto, sólo un aumento en la concentración causará un mayor entrecruzamiento macromolecular.

El TT fue un factor que cambio significativamente los parámetros reológicos estudiados, independientemente de la fuente o de la concentración, aumentando el comportamiento elástico de todas las soluciones. Este comportamiento puede ser atribuido a los cambios estructurales en las proteínas que se producen cuando se aumenta la temperatura del sistema, promoviendo el desplegamiento de su estructura y exponiendo sus grupos reactivos ($-SH$ y $-NH^{3+}$) para que ocurran nuevas interacciones proteína-proteína. A su vez, estas interacciones son las responsables del comportamiento elástico dominante, en lugar de viscoso, que resulta durante el proceso de gelación. Las proteínas de lentejas y de frijoles negros a una concentración del 10% obtuvieron un valor menor de G' que las proteínas de quinua después del tratamiento térmico, sin embargo el δ que expresa mejor el comportamiento de la solución debido a la relación entre G' y G'' demostró que los geles obtenidos con las proteínas de lentejas obtuvieron una estructura más definida y rígida que los obtenidos para quinua y frijol, lo cual se puede atribuir a su mayor contenido de enlaces SH^- y de aminoácidos reactivos (Arg, His, Lys, Arg, y Glu) (Tabla 10). Por otro lado, los valores de G' y δ en los barridos de frecuencia (Anexo 4) aumentaron a medida que aumentaba la frecuencia angular para la mayoría de las soluciones de proteínas CTT independiente de la concentración y la fuente, demostrando un comportamiento dependiente de la frecuencia que refleja una obtención de los geles con una estructura débil.

6.3.1.2. Efecto del pH y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones proteicas

La Figura 13 refleja las modificaciones en los parámetros reológicos de G' , K , n y δ generados por la modificación del pH del medio, que a su vez repercute en la estructura secundaria de la proteína. Las Figuras 13a y 13b reportan los resultados obtenidos para n y K , respectivamente, para las soluciones proteicas a pHs 5.0, 7.0 y 9.0. El n continua demostrando un comportamiento pseudoplástico de las soluciones proteicas, sin embargo, en las soluciones proteicas a un pH de 5.0 presentan un mayor comportamiento pseudoplástico que a un pH 9.0, donde las proteínas son más solubles lo que incrementa n y disminuye las interacciones entre moléculas y la viscosidad. Los valores de K para las soluciones STT independiente de la fuente y el pH se mantuvieron constantes, sin embargo, las soluciones CTT de proteínas de frijol y lentejas presentaron cambios en este parámetro. Las proteínas de frijol negro CTT a un pH de 5.0 presento una mayor resistencia al flujo que las soluciones a los otros dos pHs estudiados. Las proteínas de lentejas CTT presentaron un incremento de K a medida que incremento el pH.

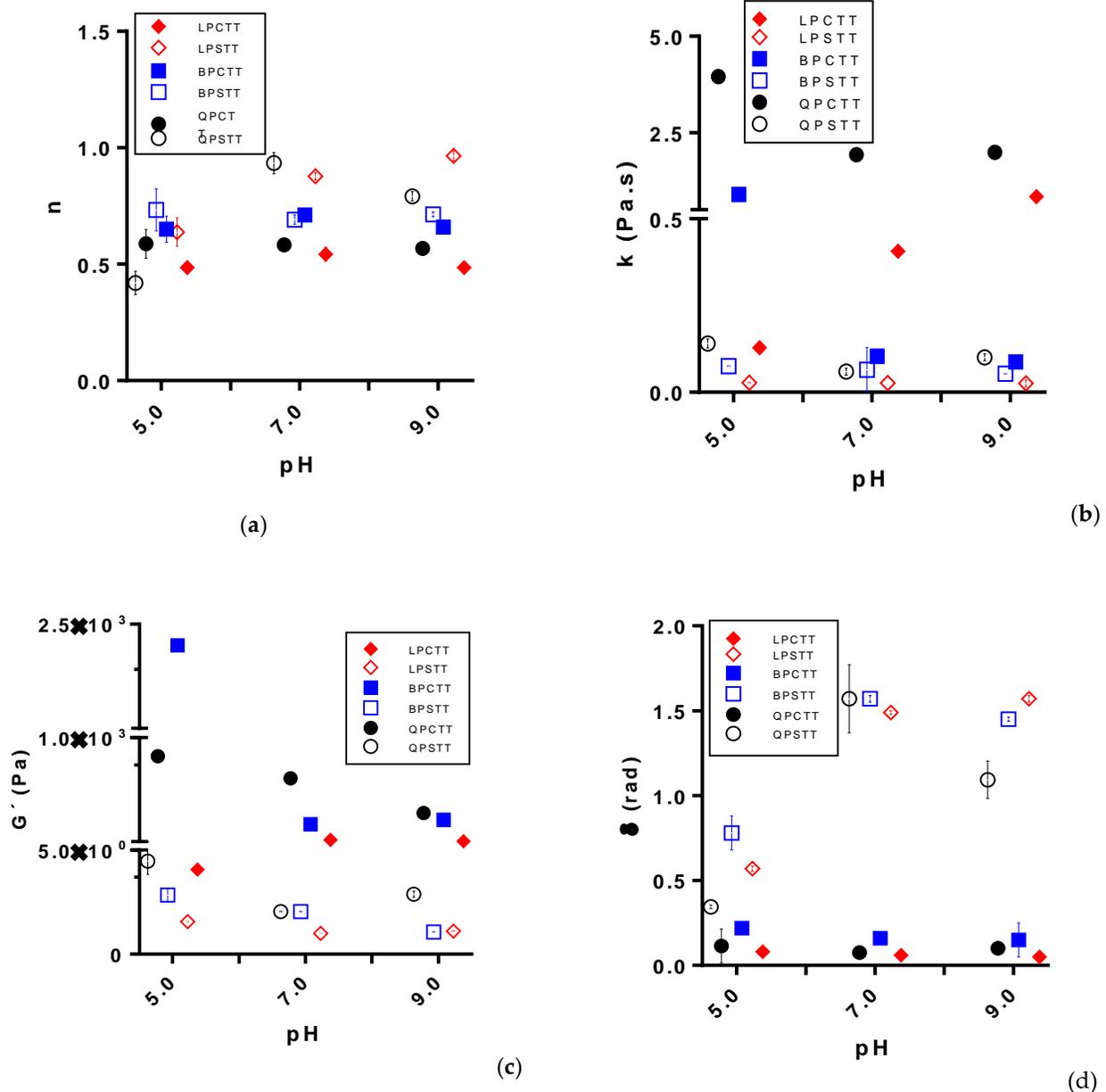
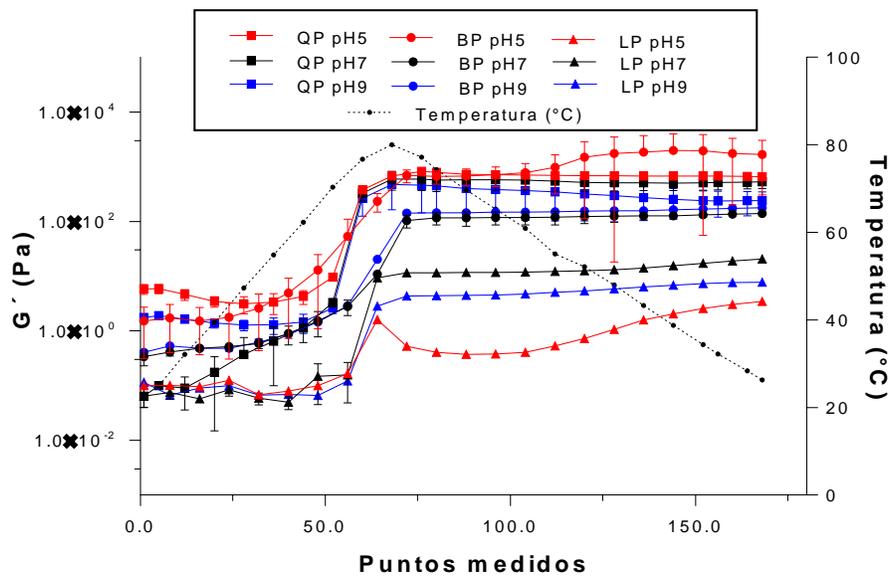


Figura 13. Efecto del pH y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), fríjol negro (BP) y lentejas (LP) con tratamiento térmico (CTT) y sin tratamiento térmico (STT). (a) promedio del comportamiento de flujo (n); (b) promedio del índice de consistencia (K); (c) promedio del módulo de almacenamiento (G') de los barridos de frecuencia; (d) promedio del ángulo de desfase (δ) de los barridos de frecuencia.

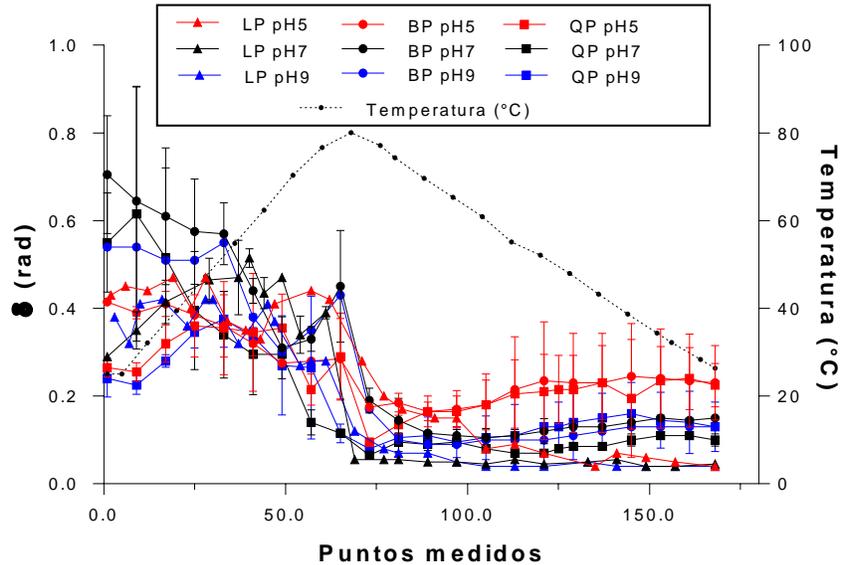
Los parámetros de G' y δ (Figuras 13c y 13d) presentaron diferencias entre las soluciones ajustadas a un pH 5.0 con las soluciones ajustadas a los otros dos pHs estudiados; 7.0 y 9.0, los cuales reportaron G' y δ cercanos para las soluciones CTT y STT. El efecto de la disminución del pH ajustado hasta 5.0 fue inversamente proporcional entre G' y δ , la Figura 13c muestra como al disminuir el pH de las soluciones proteicas STT presento un incrementó

sin importar la fuente y en el caso del δ (Figura 13d) este parámetro disminuyo, fortaleciendo la estructura gel de las soluciones de las proteínas. Estas mismas soluciones CTT a pH 5 reportaron δ menores a las soluciones STT pero comparables con los δ reportados para las otras soluciones de proteínas a pH 7.0 y 9.0 sin importar la fuente vegetal. En cambio, G' si presento diferencias entre los pHs, entre las soluciones CTT y STT, y la fuente, donde G' fue mayor para las proteínas de frijol negro, seguido de las proteínas de quinua y por ultimo las de lentejas, en las soluciones CTT a pH 5.0.

La Figura 14 muestra los barridos de temperatura y la formación de los geles de proteína, donde a medida que incrementa la temperatura G' es constante hasta lograr la temperatura donde G' incremente significativamente, determinando la temperatura de gelación. El comportamiento de la formación del gel para las soluciones de proteínas de las tres fuentes estudiadas variando su pH, se observa que no se presenta una diferencia significativa entre el comportamiento de los G' durante el TT de las soluciones de proteínas de la misma fuente a los tres pHs estudiados; sin embargo, la fuente de la proteína si presento diferencias, siendo las proteínas de quinua y frijol negro las que reportan un mayor G' . Sin embargo, al igual que en el efecto de la concentración de la proteína, δ de desfase menores fueron para los obtenidos por la proteína aislada de lentejas, sin presentar diferencias entre los pHs estudiados durante el TT.



(a)



(b)

Figura 14. Efecto del pH y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijól negro (BP) y lentejas (LP). (a) módulo de almacenamiento (G') obtenido en el barrido de temperatura; (b) ángulo de desfase (δ) obtenido en el barrido de temperatura.

La incorporación de iones H^+ y OH^- en el entorno circundante de la proteína genera efectos sobre la carga neta de los restos reactivos y cambia las interacciones electrostáticas que mantiene la estructura nativa de la proteína. A un pH de 5.0 los iones H^+ entrantes inducen una neutralización de los grupos ácidos, llegando cerca de los puntos isoeléctricos de las proteínas de la quinua y la lenteja (Tabla 10). Como resultado, se forman los agregados y, por lo tanto, la G' y la viscosidad aumentan, mientras que δ disminuye (Figuras 13c y 13d). Los iones OH^- circundantes a un pH de 9,0 inducen la ionización de los restos de los grupos carboxilo y tiol generando nuevos enlaces covalentes e interacciones con el medio, favoreciendo la solubilidad de las proteínas globulares; incrementando G' y disminuyendo δ (145). Una vez que las soluciones proteicas sufren un tratamiento térmico a los diferentes pHs, la cadena peptídica presenta movilidad y los restos o secciones hidrófobas y reactivas fueron más accesibles independientemente del pH, como resultado, se conserva los parámetros visco-elásticos, con sólo pequeñas diferencias en términos de consistencia. Además, a un pH de 9,0 la carga neta de ionización de los restos favorece la formación de enlaces covalentes, fortaleciendo la estructura tridimensional en comparación con la del pH de 5,0. Puppo y Añón (1999) evaluaron el efecto del pH en las soluciones de proteína de soja en su comportamiento viscoso (146), encontrando que las proteínas globulares (7s y 11s) aumentaron la viscosidad a un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas. Reportando un comportamiento comparable a los obtenidos en este estudio.

6.3.1.3. Efecto de Ca^{2+} y el tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las proteínas vegetales

La adición de CaCl_2 a las soluciones de proteínas STT condujo al incremento de G' y K ; y una disminución en n y δ ; sin embargo el TT al generar la desnaturalización de las proteínas alineo los parámetros reológicos de las soluciones con y sin CaCl_2 . Los resultados se muestran en la Figuras 15 y 16. La adición de sales a las soluciones de proteínas condujo a una disminución de las fuerzas de repulsión electrostática, generando un reordenamiento entre proteínas, aumentando la densidad de reticulación entre las cadenas de polipéptidos y, por lo tanto, cambiando los parámetros reológicos de la solución. Este comportamiento es descrito por la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Vervy, Overbeek) (147). Los cationes divalentes como el Ca^{2+} tienen la capacidad de formar enlaces entre los restos COO^- de proteínas, generando una estructura de gel (147).

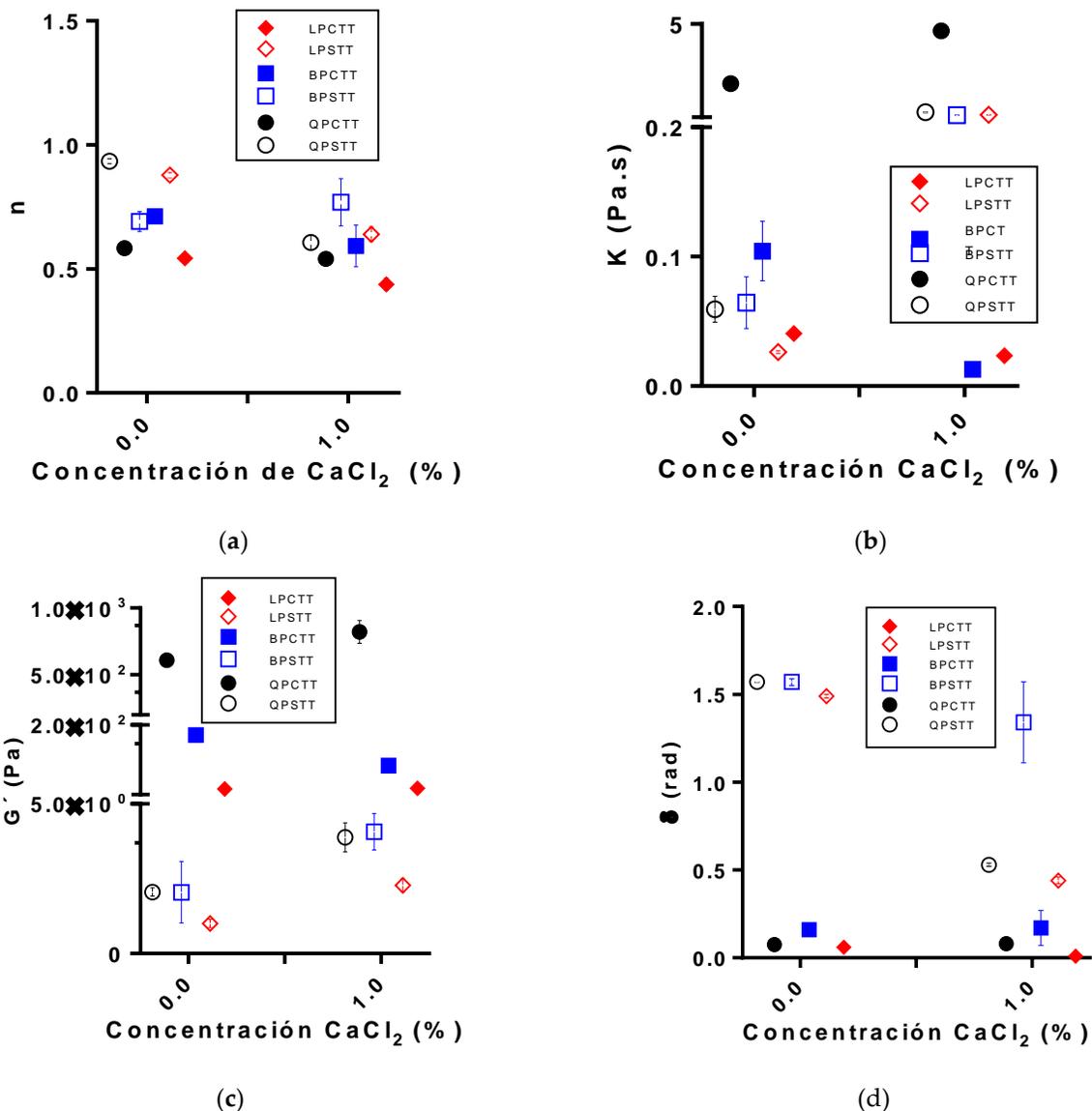
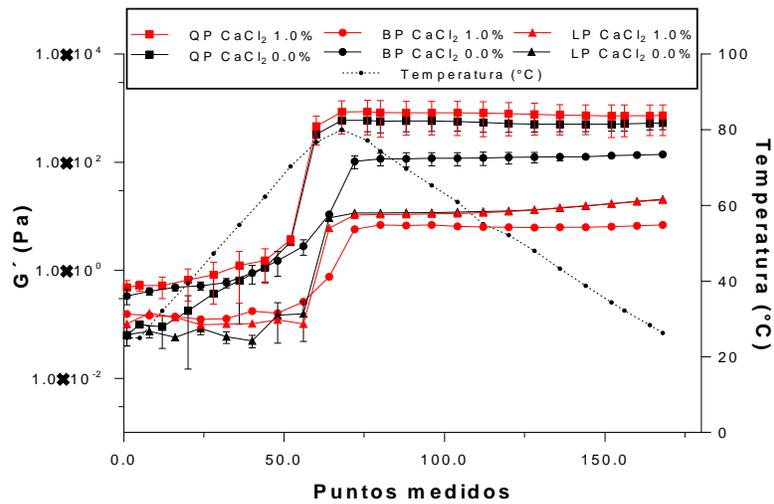
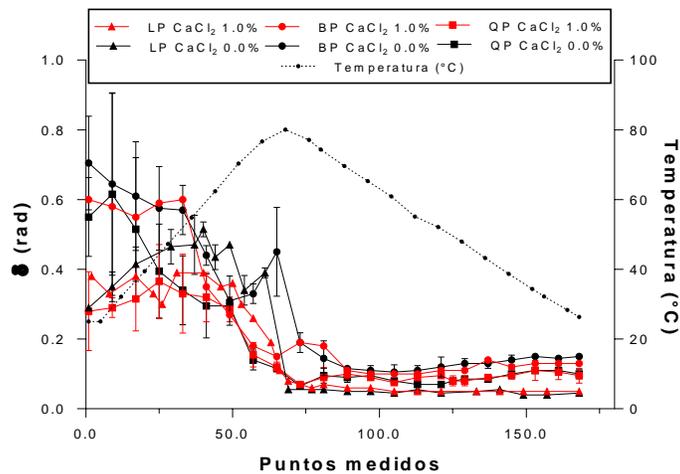


Figura 15. Efecto del CaCl_2 y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijól negro (BP) y lentejas (LP) con tratamiento térmico (CTT) y sin tratamiento térmico (STT). (a) promedio del comportamiento de flujo (n); (b) promedio del índice de consistencia (K); (c) promedio del módulo de almacenamiento (G') de los barridos de frecuencia; (d) promedio del ángulo de desfase (δ) de los barridos de frecuencia.



(a)



(b)

Figura 16. Efecto del CaCl_2 y del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones preparadas con los aislados de proteína de quinua (QP), frijól negro (BP) y lentejas (LP). (a) módulo de almacenamiento (G') obtenido en el barrido de temperatura de las

soluciones de cada aislado proteico estudiado; (b) ángulo de desfase (δ) obtenido en el barrido de temperatura de las soluciones de cada aislado proteico estudiado.

6.3.1.4 Análisis estadístico de los parámetros reológicos con respecto a los parámetros de las soluciones proteicas.

El ANOVA se utilizó para evaluar el efecto de la concentración, el pH, el Ca^{2+} y el tipo de fuente en los parámetros reológicos, como el índice de consistencia (K), el comportamiento de flujo (n), el módulo de almacenamiento (G') y el ángulo de desfase (δ). Estos resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resumen de ANOVA que muestra los resultados estadísticos de los parámetros reológicos con respecto a los parámetros de las soluciones proteicas.

Parámetros	n	k	G'	δ
	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>
Fuente de proteína	0,3306	0,0049	0,071	0,1674
Concentración (%)	0,4983	0,0008	0,0002	0,0047
pH	0,0807	0,9311	0,6526	0,117
CaCl_2 (%)	0,4278	0,7399	0,8926	0,0489
Tratamiento térmico	0,2457	0,0095	0,0013	0,0010

Diferencias significativas ($p < 0,05$) según LSD-Fisher

Los resultados indican que el tratamiento térmico y la concentración de proteínas fueron las variables que generaron un gran número de efectos significativos sobre todas las propiedades reológicas. Por el contrario, los cambios de pH no generaron ningún cambio significativo para ningún parámetro y el Ca^{2+} solo generó efecto significativo para δ , que está directamente asociado a la formación de los geles proteicos.

6.3.2. Definición de las condiciones del proceso de encapsulación por gelación iónica.

Una vez evaluados los efectos del pH, la concentración de proteína, la presencia de los iones Ca^{2+} y la temperatura en la formación de geles de proteínas, se procedió a determinar las condiciones del proceso que mejor se adapten al mecanismo de encapsulación por gelación iónica empleando las proteínas de fuentes vegetales extraídas por UAPE como material de recubrimiento. Para ello, se evaluó la capacidad de formación de partículas para cada fuente vegetal variando el tiempo de tratamiento térmico y el pH de la solución. Como condiciones constantes, se definió una temperatura de tratamiento térmico a 80°C , una concentración de proteína al 10% y un proceso de homogenización a 8.000 rpm durante 1 min. Cada solución fue extruida manualmente utilizando una jeringa con aguja calibre 21 sobre una solución de CaCl_2 al 10 %. La Tabla 12 muestra la matriz experimental aleatorizada empleada para la evaluación de la formación de las minicápsulas. Las condiciones constantes fueron determinadas con base a los resultados reológicos y de composición descritas previamente. El pH básico es el rango donde se demostró que las proteínas mejoran su solubilidad y además los grupos carboxilos presentes en la estructura de los aminoácidos principales de las proteínas vegetales (ácido aspártico y glutámico) se encuentran ionizados, disponibles a reaccionar con los iones Ca^{2+} (76). El tiempo del tratamiento térmico está relacionado con la

desnaturalización de la proteína, lo cual es necesario para potencializar la formación de los geles (76).

Tabla 12. Matriz experimental para la determinación del pH y tiempo de tratamiento térmico para el mecanismo de encapsulación por gelación iónica.

pH	Tiempo (min)
8	10
8	30
8	60
8	120
9	10
9	30
9	60
9	120
10	10
10	30
10	60
10	120
11	10
11	30
11	60
11	120

La Figura 17 muestra los resultados de los encapsulados a condiciones donde se observa que las proteínas aisladas de fríjol negro no presentaron la capacidad de formación de geles bajo estas condiciones de proceso (Figura 17a), esto posiblemente debido al menor contenido de aminoácidos como el ácido glutámico y aspártico, y aminoácidos con grupos tiol como la cisteína (Figura 7), que están estrechamente relacionados con la formación de geles (76). Mientras que, en las Figuras 17b y 17c se observa la formación de las cápsulas cuando se utiliza los aislados proteicos obtenidos de lenteja y de quinua, respectivamente, así como, las cápsulas formadas con las proteínas de soya y de caseinato de sodio utilizadas como controles positivos (Figuras 17d y 17e). Estas pruebas mostraron que las mejores condiciones de encapsulación se obtuvieron a un pH de 9.0 para las proteínas de lenteja, quinua y soya, mientras que para el caseinato de sodio el pH donde presentó mejor formación de cápsulas de hidrogeles fue a un pH 11. También se logró establecer que el tiempo mínimo de calentamiento a 80°C es de 60min para todas las proteínas, donde se garantiza la desnaturalización de la proteína necesaria para favorecer la formación de los hidrogeles.



pH 8 – 10 min



pH 11 – 120 min

(a)



pH 8 – 10 min



pH 9 – 30 min

(b)



pH 8 – 10 min



pH 10 – 60 min

(c)

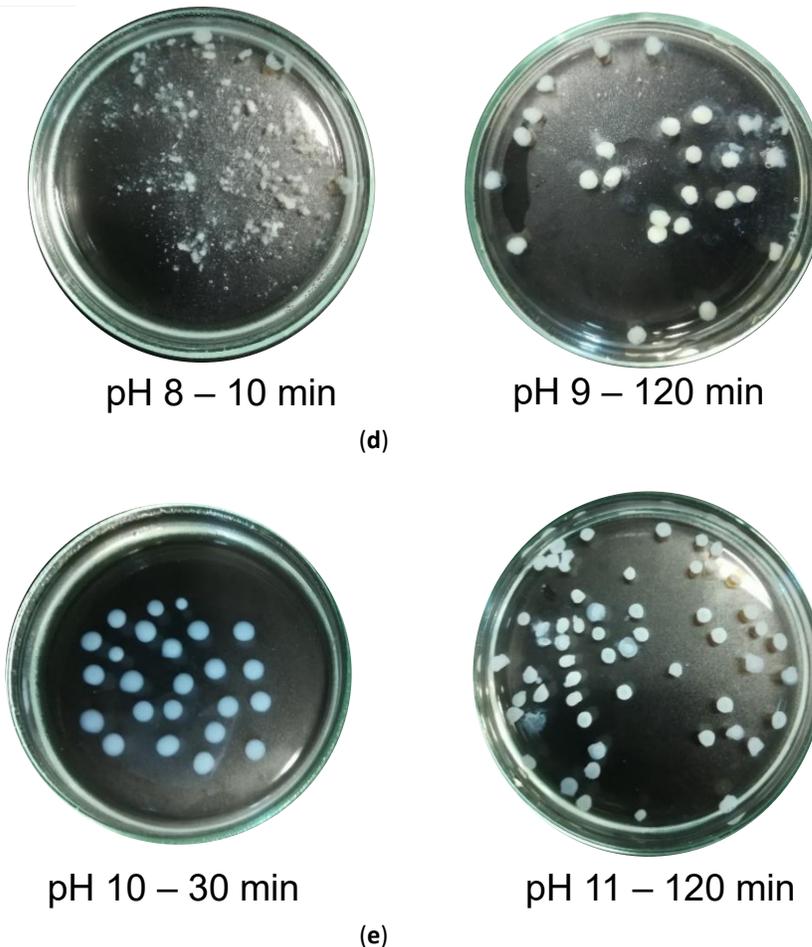


Figura 17. Formación de minicápsulas con (a) proteínas de frijol negro; (b) proteínas de lentejas; (c) proteínas de quinua; (d) proteínas de soya; (e) caseinato de sodio.

En la Figura 18 se ilustra el flujograma del proceso de encapsulación por la metodología de gelación iónica, empleando proteínas como materiales de recubrimiento.



Figura 18. Flujograma del proceso de encapsulación por gelación iónica, empleando proteínas como material de recubrimiento.

6.4. Modificación estructural de las proteínas vegetales y evaluación de la capacidad encapsulante por gelación iónica (Anexo 5).

En consecuencia de la capacidad de las proteínas de quinua y lentejas de formar las capsulas evaluadas en la sección 6.3, estas fueron modificadas estructuralmente por hidrólisis enzimática, N-acilación y N-cationización. De igual forma fue usado un aislado de proteína de soya (SP) como proteína vegetal de referencia. Las proteínas frijol negro al no presentar la capacidad de formación de capsulas, no fueron modificadas ni empleadas para el proceso de encapsulación por gelación iónica.

6.4.1. Modificación de las proteínas nativas

Los grados de modificación de las proteínas se muestran en la Tabla 13. Los resultados obtenidos después de las modificaciones de las proteínas por hidrólisis enzimática, N-acilación y N-cationización, mostraron que las proteínas obtuvieron valores relativamente comprables en el proceso de hidrólisis enzimática tanto a 15 como a 60 minutos, indiferente a la fuente de la proteína. Sin embargo, los procesos químicos como la N-acilación y N-cationización presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las fuentes. Las proteínas de quinua fueron las proteínas vegetales que presentaron el menor porcentaje de modificación para N-acilación y N-cationización (10,53 % y 7,89 %, respectivamente), seguida de las proteínas de soya y lentejas (67,18 % y 66,64 %). La variación en el porcentaje de modificación de las proteínas es atribuida a la disposición de los grupos NH_2 en la estructura de la proteína, acorde a los plegamientos de esta y al impedimento estérico que puede generar los grupos cercanos en estas condiciones experimentales (148). En las proteínas de soya se

han reportados modificaciones como la N-acilación y N-cationización, reportando grados de modificación superiores a los obtenidos en este estudio; ~60 % para N-acilación y ~92 % para N-cationización de proteínas de soya obtenidas por precipitación ácida (54,148). Lo cual demuestra que el método de obtención de la proteína y el tipo de proteína son factores que influyen en estas dos modificaciones estructurales químicas. Por otro lado, las hidrólisis enzimáticas empleando Alcalasa 2.4L lograron porcentajes para las proteínas de fuentes vegetales comparables con los resultados reportados en la literatura (54,149).

Tabla 13. Grado de modificación de proteínas nativas.

Fuente	Modificación	Grado de modificación (%)
ASP	Acilación con DDC	42,63 ^b ± 0,43
AQP		10,53 ^c ± 0,55
ALP		67,18 ^d ± 0,3
CSP	Cationización con GTMAC	34,21 ^b ± 0,56
CQP		7,89 ^a ± 0,95
CLP		66,64 ^c ± 0,18
H15SP	Hidrólisis enzimática	16,46 ^b ± 0,33
H15QP		21,04 ^c ± 0,74
H15LP		22,73 ^c ± 0,22
H60SP		19,86 ^b ± 0,17
H60QP		19,79 ^a ± 0,44
H60LP		22,93 ^c ± 0,18

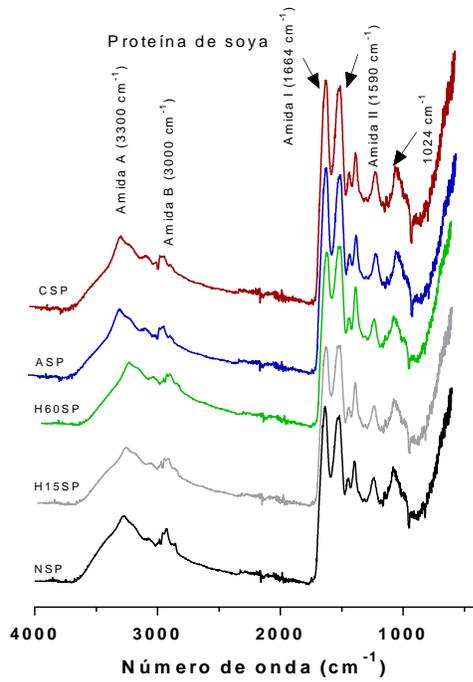
Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3); ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min.

6.4.2. Caracterización estructural y de propiedades funcionales de las proteínas nativas y modificadas

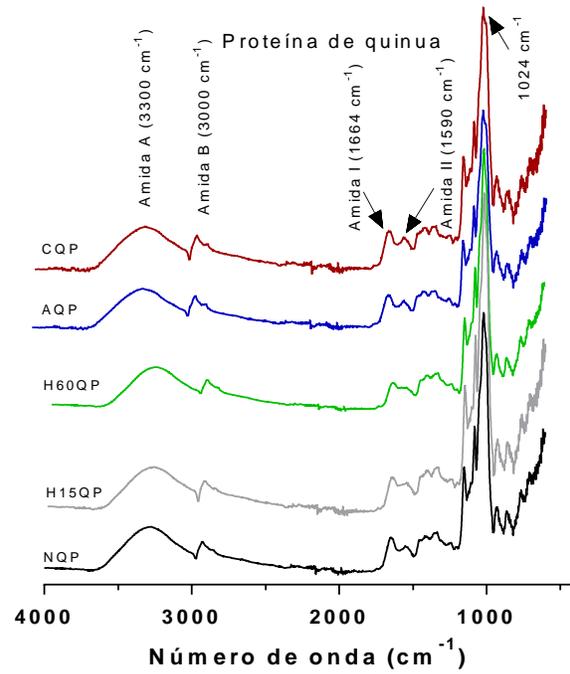
6.4.2.1. Efecto de las modificaciones de las proteínas en su estructura secundaria.

Una vez que las proteínas fueron modificadas estructuralmente y secadas por liofilización, se evaluaron los espectros FT-IR de cada una de ellas y se analizó la deconvolución de los espectros en la región de la amida I (1.700 a 1.600 cm⁻¹), la cual es la región más sensible para estimar la proporción de los diferentes plegamientos en las estructuras secundarias (hojas β, hélice α, rondon coll y pliegues). La Figura 19 muestra los espectros FT-IR para las proteínas vegetales de soya (Figura 19a), quinua (Figura 19b) y lentejas (Figura 19c). Las bandas correspondientes al rango de emisión entre 3000 y 3500 cm⁻¹ corresponde a los grupos OH⁻, NH y algunos grupos COO⁻ de aminoácidos en la estructura de la proteína. Estas bandas presentaron un incremento para las proteínas modificadas por N-acilación y N-cationización sin diferencias en la fuente de la proteína, claramente el incremento es mayor para las

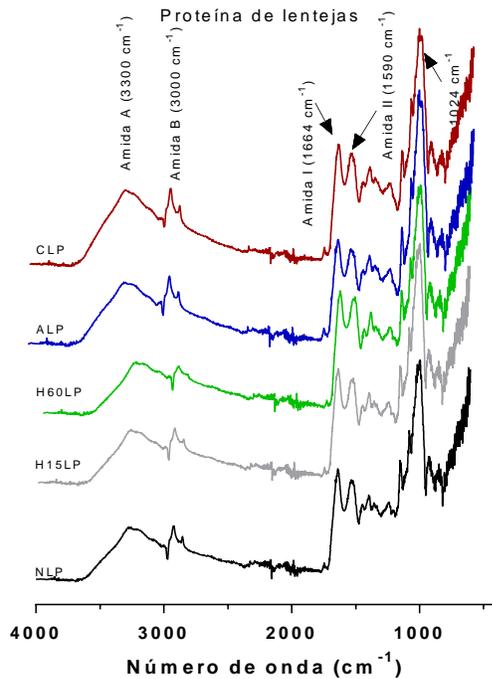
proteínas de lentejas, las cuales presentaron un mayor porcentaje del grado de modificación (Tabla 13). Las bandas características a la amida I y la amida II se presentaron para todas las muestras, indiferente a la fuente y modificación, sin embargo, las muestras modificadas por hidrólisis enzimática presentaron una leve disminución en la definición de estas bandas (150).



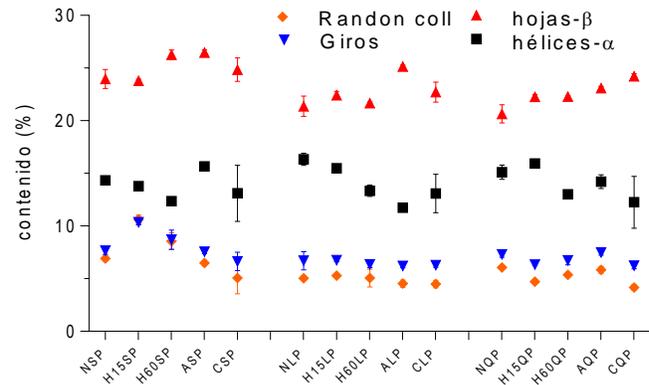
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 19. Espectro FT-IR y contenido de plegamientos (d) (hélices- α , hojas β , randon coll y plegamientos) en la estructura secundaria de las proteínas nativas (y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática de soya (a), quinua (b) y lentejas (c)). NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSCP: caseinato de sodio N-catinizado, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min.

El análisis de la estructura secundaria de las proteínas nativas y modificadas se muestra en la Figura 19d. Las estructuras de hélices α , hojas β y randon coll fueron observadas en los espectros deconvolucionados acordes a cuatro bandas principales de Gauss centradas en ~ 1654 , ~ 1638 y ~ 1670 cm^{-1} (114). Los resultados obtenidos reportan un contenido promedio entre ~ 5 al 10% de randon coll y plegamientos en la estructura secundaria de las proteínas indiferente a la fuente. Además, estos porcentajes de la estructura secundaria; tipo randon coll y plegamientos se mantuvieron constantes para las modificaciones químicas y enzimáticas para todas las proteínas (Figura 19d).

El contenido de hélices- α fue el segundo plegamiento con mayor porcentaje después de las hojas- β para todas las proteínas nativas y modificadas, sin embargo, en las modificaciones enzimáticas presento una leve disminución, a mayor tiempo de hidrólisis, mayor la disminución del contenido de hélices α en la estructura secundaria de la proteína. Esto posiblemente por el

rompimiento de los enlaces peptídicos ocasionados por la Alcalasa 24 L, al romper estos enlaces, toda la estructura secundaria se modifica. Los efectos de la hidrólisis enzimática sobre las proteínas nativas no son tan marcados en los análisis de los espectros de FT-IR y la estructura secundaria debido a que el análisis se realiza a un conjunto de proteínas obtenidas de una fuente específica, siendo las bandas la expresión del ponderado de todas las proteínas presentes.

La Figura 19d muestra que la proporción media de hojas- β para todas las proteínas, tanto nativas como modificadas, fue entre el 20 y 30 %. Los resultados obtenidos para las hojas β fueron consistentes con los reportados para proteínas de diferentes fuentes vegetales, donde los plegamientos tipo hojas- β son los predominantes (114). Xuan Li et al. en 2018 reportaron un porcentaje de $\sim 29\%$ hojas β para proteínas aisladas de quínoa (149). De igual forma Meng y Ma (2001) informaron un 36% y 19 % de los plegamientos de la estructura secundaria de las globulinas de frijol con hojas β y hélices α , respectivamente (151). Por otro lado, se reportó que las proteínas de lentejas cuentan con un porcentaje del 47% de estructuras de hojas β contra un $\sim 25\%$ que se cuantificó en las muestras de proteínas nativas de lentejas (152).

6.4.2.2. Efecto de la modificación de las proteínas en su temperatura de desnaturalización.

La técnica DSC es usualmente empleada para determinar las transiciones de fase vítrea o la desnaturalización de la mayoría de los biopolímeros, incluyendo las proteínas. La Figura 20 muestra los termogramas de los polvos de proteínas nativas de soya, quinua y lentejas con una humedad entre el 5 al 10 %. En general, los termogramas de las proteínas reportan dos picos endotérmicos, el primero (T_{d1}) entre 40 a 80°C es asociado a la descomposición de las interacciones débiles (enlaces de hidrogeno, interacciones hidrofobicas y electrostáticas) lo que conlleva a la desnaturalización de las proteínas; y el segundo pico sobre los 100 °C (T_{d2}) está asociado a la descomposición de la proteína sobrepuesta con la evaporación del agua (137).

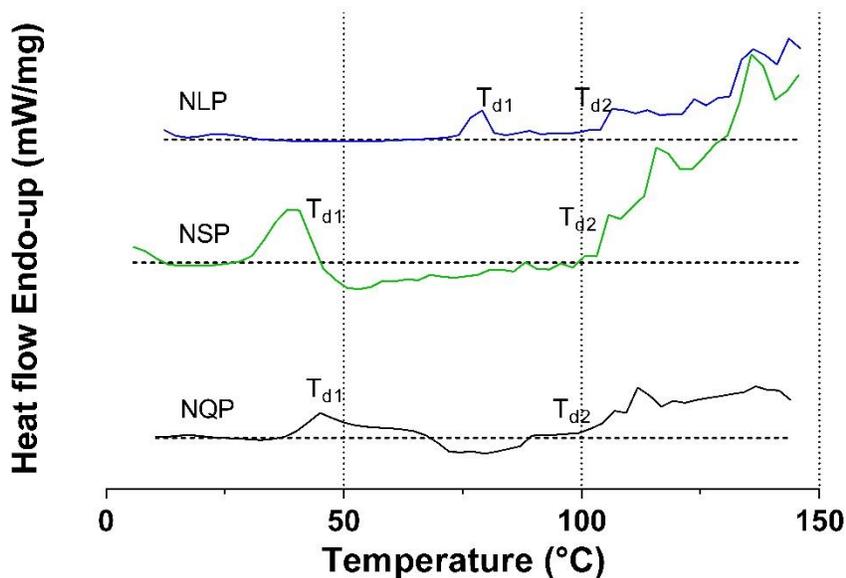


Figura 20. Termograma de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) del caseinato de sodio y proteínas de quinua, lentejas y soya nativas. NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, T_{d1} : temperatura de desnaturalización, T_{d2} : temperatura de degradación.

En la Tabla 14 se reportan los T_{d1} y T_{d2} obtenidos para todas las proteínas estudiadas, tanto en su estado nativo como en su estado modificado. En general, las proteínas de fuentes vegetales nativas y modificadas si presentaron picos atribuidos a T_{d1} , exceptuando las proteínas hidrolizadas (Tabla 14). Las T_{d1} mayores fueron las reportadas para las proteínas de lentejas, indiferente si estaba en su estado nativo o modificadas, lo cual es debido a la estrecha relación entre T_{d1} con la composición de aminoácidos y la estructura de la proteína expresada en las conformaciones involucradas como las hélices α , hojas β , rondon coll y plegamientos; donde a mayor sea la cadena de aminoácidos y el plegamientos en la estructura de la proteína, mayor será el requerimiento energético para la desnaturalización y por ende mayor será la T_{d1} (114). Este comportamiento es respaldado por los resultados reportados en la Figura 8 y 19; donde se reporta que las proteínas presentaron un porcentaje comparable en el contenido de hélices α , hojas β pero las proteínas de lentejas reportan un mayor peso molecular. De igual forma, Carbonaro et al. en 2008 estudiaron la estabilidad térmica de las proteínas extraídas de lentejas y de frijol negro, reportando que las proteínas de lentejas presentan una mayor estabilidad térmica comparadas con las proteínas de frijol, atribuido principalmente al mayor contenido de hojas β (153). El efecto de las proteínas hidrolizadas es debido a la desnaturalización parcial por las enzimas empleadas en el proceso de hidrólisis, las cuales cortaron los enlaces peptídicos entre aminoácidos de las proteínas, lo que conlleva a un gasto menor en la energía aplicada para el proceso de desnaturalización de las proteínas ya hidrolizadas, energía que no es suficiente para generar los picos endotérmicos. Este comportamiento es acorde al descrito por Molina E. y Cañon M en 2001(154), los cuales

estudiaron el comportamiento térmico de proteínas de soya sin hidrólisis y con varios grados de hidrólisis, determinando que a mayor es el grado de hidrólisis, el pico endotérmico que describe el procesos de desnaturalización, disminuye significativamente (154).

Tabla 14. Temperaturas de evaporación y desnaturalización de las proteínas de soya, quinua y lentejas nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.

Fuente	Td ₁ (°C)	Td ₂ (°C)
NSP	40,69 ± 0,35	105,7 ± 0,22
H15SP	47,71 ± 1,35	105,07 ± 1,45
H60SP	-----	126,71 ± 0,36
ASP	63,67 ± 0,61	106,17 ± 0,14
CSP	53,97 ± 0,81	103,97 ± 0,24
NQP	45,11 ± 1,35	97,12 ± 2,14
H15QP	-----	93,24 ± 1,09
H60QP	-----	75,58 ± 1,44
AQP	52,13 ± 2,07	97,11 ± 2,09
CQP	40,97 ± 1,85	103,97 ± 1,99
NLP	74,81 ± 1,37	109,82 ± 1,22
H15LP	-----	104,98 ± 2,47
H60LP	-----	104,99 ± 2,00
ALP	76,74 ± 1,05	104,24 ± 2,47
CLP	70,98 ± 2,07	118,04 ± 1,91

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). NSP: proteína de soya nativa, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, ASP: proteína de soya N-acilada, CSP: proteína de soya N-catinizada, NQP: proteína de quinua nativa, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, AQP: proteína de quinua N-acilada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, NLP: proteína de lentejas nativa, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada. Td1: temperatura de desnaturalización, Td2: temperatura de degradación

En cuento a las proteínas modificadas por N-acilación y N-cationización, se obtuvieron incrementos en las Td₁ reportadas (Tabla 13). Las modificaciones por N-acilación y N-cationización afecta la conformación de proteínas al promover el despliegue de la estructura terciaria, lo cual favorece propiedades funcionales como la solubilidad de la proteína (54). Al incrementar la solubilidad de la proteína, los puentes de hidrogeno con el agua se incrementa y la proteína presenta mayor agua ligada que las proteínas nativas, por lo tanto es necesario una mayor temperatura en el tratamiento térmico para la desnaturalización de la proteína (155).

6.4.2.2. Efecto de la modificación de las proteínas en sus propiedades funcionales.

El perfil de solubilidad de las proteínas en función del pH fue considerado como una guía para la funcionalidad de las proteínas nativas y modificadas, ya que esta se relaciona directamente con muchas propiedades funcionales como la capacidad emulsificante, formación de espumas y formación de geles (114). Las proteínas nativas de soya, quinua, lentejas reportaron un perfil de solubilidad típico en forma de U para las proteínas (Figura 21), donde a pH más altos se reportaron los mayores porcentajes de solubilidad y a pH bajos, se

obtuvieron porcentajes de solubilidad mayores a los obtenidos entre el rango de pH 4 a 6, entre el cual está el pl de las proteínas (pH 5.0) (Tabla 10).

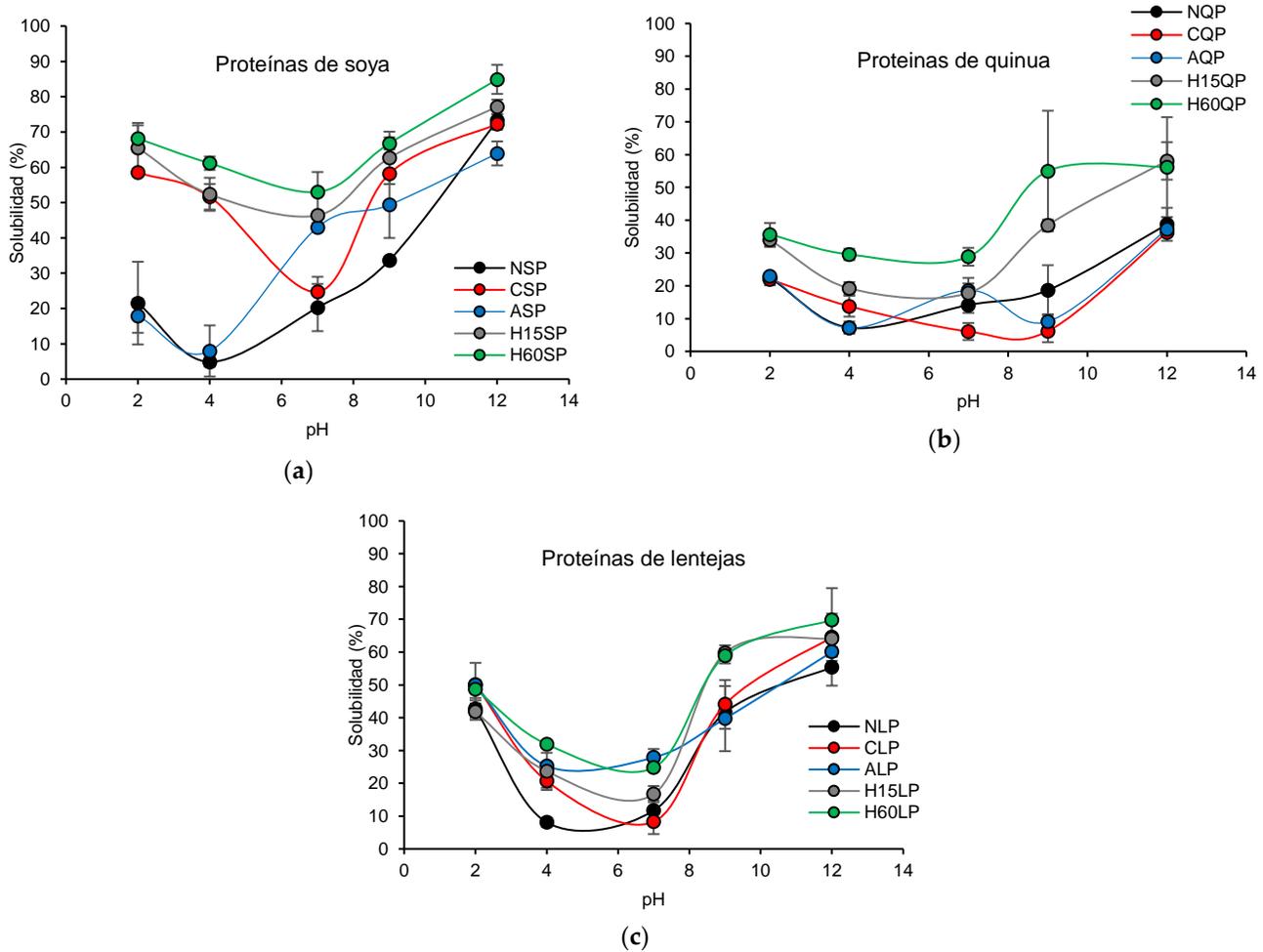


Figura 21. Efecto del pH en el perfil de solubilidad de las proteínas de soya (a), quinua (b) y lentejas (c) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática; NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min.

En general, los porcentajes de solubilidad incrementaron en todo en rango de pHs estudiado al realizar el proceso de hidrólisis de las proteínas comparado con las proteínas

nativas. Al realizar el procesos de hidrólisis se obtienen péptidos solubles y un mayor número de grupos carboxilos y amino ionizables expuestos que mejoran la solubilidad de la proteína (114). Debido al grado de hidrólisis tan cercano entre los tratamientos de 15 min y 60 min para todas las fuentes de proteínas (Tabla 12), los perfiles de solubilidad son muy comparables entre ambos tiempos del proceso de hidrólisis, para la misma fuente proteica. Estos resultados coinciden con otros reportes donde el proceso de hidrólisis favorece la solubilidad de las proteínas de soya, lentejas y quinua (90,156,157). Los perfiles de solubilidad de las proteínas modificadas por N-cationización y N-acilación presentaron modificaciones comparado con los perfiles de las proteínas nativas, estas modificaciones fueron acordes al porcentaje del grado de modificaciones reportado en la Tabla 12, mayor modificación para las proteínas de lentejas, seguidas de las proteínas de soya, quinua y caseinato de sodio, respectivamente. Las proteínas modificadas por N-cationización obtuvieron un perfil con mayor solubilidad en los rangos del pHs ácidos, comparado con las proteínas nativas. Sin embargo estas mismas proteínas modificadas reportaron porcentajes de solubilidad menores cercanos a pH 7. Esto debido al proceso de cationización, el cual aumentó el número de cargas positivas netas de la proteína y se redujo el número NH_2 disponibles; lo cual genero un cambio en el equilibrio general entre grupos ácidos y básicos en la proteína nativa, resultando en el fenómeno de cambio del perfil de solubilidad como se muestran en la Figura 21. De igual forma, las proteínas modificadas por N-acilación presentaron modificación en sus perfiles de solubilidad, incrementando los porcentajes de solubilidad entre el rango de pH entre 4 a 9; debido a la disminución de los grupos NH_2 reactivos que ya reaccionaron durante el procesos de modificación.

Las propiedades y características funcionales de las proteínas nativas y modificadas se muestran en las Tablas 15 a la 17. Los resultados obtenidos para las propiedades evaluadas en las proteínas nativas reportados en las Tablas 15 a la 17 fueron acorde a los reportados en la Tabla 9. El tipo de modificación estructural fue la variable independiente de los parámetros estudiados. Los parámetros estructurales como el potencial Z (ζ), el punto isoeléctrico (pI), el peso molécula (MW) y los grupos tiol libres (SH) fueron parámetros que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las proteínas modificadas y la proteína nativa. El ζ de las dispersiones de proteínas nativas y modificadas a pH10; pH en el cual las proteínas presentaron su mayor porcentaje de solubilidad (Figura 21), reporto disminución para las proteínas modificadas por N-cationización y N-acilación, y para las proteínas hidrolizadas, presentaron valores de ζ comparables con los obtenidos para las proteínas nativas; en algunos casos, y en los otros disminuyo el valor de ζ , dependiendo de la fuente de la proteína. Los valores obtenidos para el ζ de todas las proteínas a pH 10 fueron negativos, esto debido a la alta cantidad de cargas negativas en las cadenas de las proteínas en el medio alcalino. Después del procesos de modificación por N-cationización y N-acilación y debido a la neutralización, los grupos amino primarios fueron reemplazados por grupos cargados positivamente que provienen del DDC y GTMAC (68). Por lo tanto la cuantificación del ζ confirmo la reprivatización de la proteína por N-cationización y N-acilación, y a su vez, el incremento del ζ se relacionó con el porcentaje del grado de modificación de cada fuente de proteína. En relación la variación del perfil de solubilidad y el ζ de las proteínas nativas y

modificadas, el *pI* de las proteínas presentó una tendencia de incremento para las proteínas modificadas por N-cationización y N-acilación, a pesar de que no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla 15. Propiedades de proteínas de soya nativa y modificada por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.

Parámetro	Proteínas aisladas de soya				
	NSP	ASP	CSP	H15SP	H60SP
ζ pH10 (mV)	-25,54 ^a ± 3,70	-20,27 ^b ± 1,05	-24,3 ^a ± 2,22	-29,70 ^c ± 0,79	-31,07 ^c ± 1,26
MW (kDa)	250, 100, 75, 50, 37, 15 to 10	250, 75, 50, 37, 15 to 10	250, 75, 50, 37, 15 to 10	≤ 10	≤ 10
<i>pI</i>	3,00 ^a ± 1,00	3,00 ^a ± 1,00	5,00 ^{bc} ± 1,00	4,00 ^{ac} ± 1,00	4,00 ^{ac} ± 1,00
SH (μM SH / g)	1,28 ^a ± 0,08	1,60 ^a ± 0,20	1,50 ^a ± 0,17	3,35 ^b ± 0,16	5,28 ^b ± 0,79
WAC (%)	621,84 ^a ± 7,27	630,13 ^a ± 62,27	788,68 ^b ± 48,39	201,26 ^c ± 12,79	232,14 ^c ± 6,22
FAC (%)	328,77 ^a ± 8,30	362,80 ^b ± 3,95	348 ^a ,06 ± 2,18	312,268 ^a ± 6,31	321,47 ^a ± 11,22
EAI (m2/g)	49,04 ^a ± 0,34	42,42 ^b ± 0,19	37,97 ^c ± 0,42	37,81 ^d ± 0,48	33,12 ^e ± 0,06
ESI (min)	70,68 ^a ± 1,48	73,35 ^b ± 3,79	78,12 ^c ± 4,70	100,64 ^d ± 6,23	67,14 ^a ± 3,73
ζ_e (mV)	-30,67 ^a ± 4,25	-65,33 ^b ± 10,08	-65,53 ^b ± 15,35	-63,16 ^b ± 1,35	-45,66 ^a ± 0,45
Tgel (°C)	74,76 ^a ± 1,27	79,17 ^b ± 2,7	67,01 ^c ± 1,62	-----	-----

Los valores se expresan como media ± desviación estándar ($n = 3$); NSP: proteína de soya nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, CSP: proteína de soya N-catinizada, 60 min, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, MW: peso molecular, IP: punto isoelectrico, SH: grupos tiol, WHC: capacidad de retención de agua, FAC: Capacidad de absorción de grasa, EAI: índice de actividad emulsionante, ESI: índice de estabilidad emulsionante, Tgel: Temperatura de gelificación, ζ pH10: potencial z de la solución a pH 10, ζ_e : potencial z de la emulsión.

Tabla 16. Propiedades de proteínas de quinua nativa y modificada por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.

Parámetro	Proteínas aisladas de quinua				
	NQP	AQP	CQP	H15QP	H60QP
ζ pH10 (mV)	-32,13 ^a ± 1,64	-31,67 ^a ± 3,35	-31,31 ^a ± 1,77	-24,46 ^b ± 1,21	-23,52 ^b ± 1,21
MW (kDa)	100 to 50	100 to 50	100 to 50	≤ 10	≤ 10
<i>pI</i>	5,00 ^a ± 1,00	5,00 ^a ± 1,00	6,00 ^a ± 1,00	5,00 ^a ± 1,00	5,00 ^a ± 1,00
SH (μM SH / g)	10,25 ^a ± 0,83	9,39 ^a ± 2,03	16,43 ^{ab} ± 1,59	10,20 ^b ± 8,95	17,09 ^b ± 0,68
WAC (%)	106,94 ^a ± 0,24	114,32 ^a ± 11,88	111,53 ^a ± 8,62	71,51 ^b ± 1,84	82,35 ^c ± 12,58
FAC (%)	174,46 ^{ab} ± 0,23	200,46 ^a ± 9,62	190,42 ^c ± 6,43	163,26 ^{cd} ± 19,66	174,46 ^{bd} ± 0,24
EAI (m2/g)	55,67 ^a ± 0,31	57,86 ^b ± 0,11	54,09 ^c ± 0,45	61,13 ^d ± 0,56	50,97 ^e ± 0,048
ESI (min)	65,88 ^{ab} ± 3,56	95,89 ^c ± 10,22	76,78 ^b ± 4,49	76,15 ^b ± 3,30	58,38 ^a ± 11,78
ζ_e (mV)	-32,96 ^b ± 0,75	-36,36 ^{ac} ± 0,66	-34,15 ^{ab} ± 2,55	-37,27 ^c ± 1,13	-34,06 ^{ab} ± 0,68
Tgel (°C)	68,29 ^a ± 2,98	69,15 ^a ± 1,41	76,04 ^b ± 4,24	-----	-----

Los valores se expresan como media ± desviación estándar ($n = 3$); NQP: proteína de quinua nativa, AQP: proteína de quinua N-acilada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, MW: peso molecular, IP: punto isoelectrico, SH: grupos tiol, WHC: capacidad de retención de agua, FAC: Capacidad de absorción de grasa, EAI: índice de actividad

emulsionante, ESI: índice de estabilidad emulsionante, Tgel: Temperatura de gelificación, ζ pH10: potencial z de la solución a pH 10, ζ E: potencial z de la emulsión.

Tabla 17. Propiedades de proteínas de lenteja nativa y modificada por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática.

Parámetro	Proteínas aisladas de lentejas				
	NLP	ALP	CLP	H15LP	H60LP
ζ pH10 (mV)	-22,87 ^a ± 1,88	-17,27 ^b ± 1,27	-14,45 ^b ± 0,67	-35,77 ^c ± 2,31	-31,43 ^d ± 2,58
MW (kDa)	250 to 50	250 to 50	250 to 50	≤ 10	≤ 10
pI	5,00 ^a ± 1,00	6,00 ^a ± 1,00	6,00 ^a ± 1,00	5,00 ^a ± 1,00	5,00 ^a ± 1,00
SH (μ M SH / g)	15,17 ^a ± 0,60	15,48 ^a ± 6,70	14,82 ^a ± 1,73	14,66 ^a ± 1,09	16,41 ^a ± 2,11
WAC (%)	171,68 ^a ± 18,37	148,44 ^a ± 7,04	189,32 ^a ± 10,79	72,01 ^b ± 4,32	58,49 ^b ± 11,76
FAC (%)	214,52 ^a ± 17,93	259,93 ^{cd} ± 7,23	265,56 ^d ± 3,08	227,80 ^{ab} ± 6,88	243,71 ^{bc} ± 7,35
EAI (m2/g)	35,94 ^a ± 0,22	39,85 ^b ± 0,08	37,81 ^b ± 1,30	36,89 ^c ± 0,51	33,28 ^d ± 0,05
ESI (min)	88,71 ^a ± 1,57	130,24 ^b ± 5,80	60,09 ^c ± 8,25	240,04 ^d ± 24,49	145,31 ^b ± 3,31
ζ_e (mV)	-40,46 ^a ± 4,46	-40,33 ^a ± 3,50	-32,47 ^b ± 0,96	-70,65 ^c ± 4,57	-51,97 ^d ± 2,21
Tgel (°C)	64,08 ^a ± 3,07	68,29 ^{ab} ± 3,50	70,17 ^b ± 2,98	-----	-----

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3); NLP: proteína de lentejas nativas, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min, MW: peso molecular, IP: punto isoeléctrico, SH: grupos tiol, WHC: capacidad de retención de agua, FAC: Capacidad de absorción de grasa, EAI: índice de actividad emulsionante, ESI: índice de estabilidad emulsionante, Tgel: Temperatura de gelificación, ζ pH10: potencial z de la solución a pH 10, ζ E: potencial z de la emulsión.

El MW de las proteínas modificadas por N-cationización y N-acilación se mantuvo constante comparado con el MW de las proteínas nativas. Sin embargo, y como era de esperarse el MW de las proteínas sometidas al proceso de hidrólisis enzimática disminuyó significativamente gracias al rompimiento de los enlaces peptídicos de la estructura de la proteína, como se muestra en las Tablas 15 a la 17 y en la Figura 22. El rompimiento de estos enlaces peptídicos en el proceso de hidrólisis enzimática, generó la exposición de los grupos SH de la proteína que no estaban libres en la estructura nativa, por lo que el incremento estadísticamente significativo en este parámetro, se observó en las proteínas hidrolizadas comparadas con las proteínas nativas. Las proteínas modificadas por N-cationización y N-acilación no presentaron un comportamiento uniforme en la variación de los grupos SH, sin embargo esta variación es debido a la modificación estructural que genera la incorporación de DDC y GTMAC, la cual favorece el despegamiento de la estructura terciaria de las proteínas, exponiendo algunos grupos funcionales que se encontraban enterrados en el interior de la estructura terciaria de la proteína en su estado nativo (68).

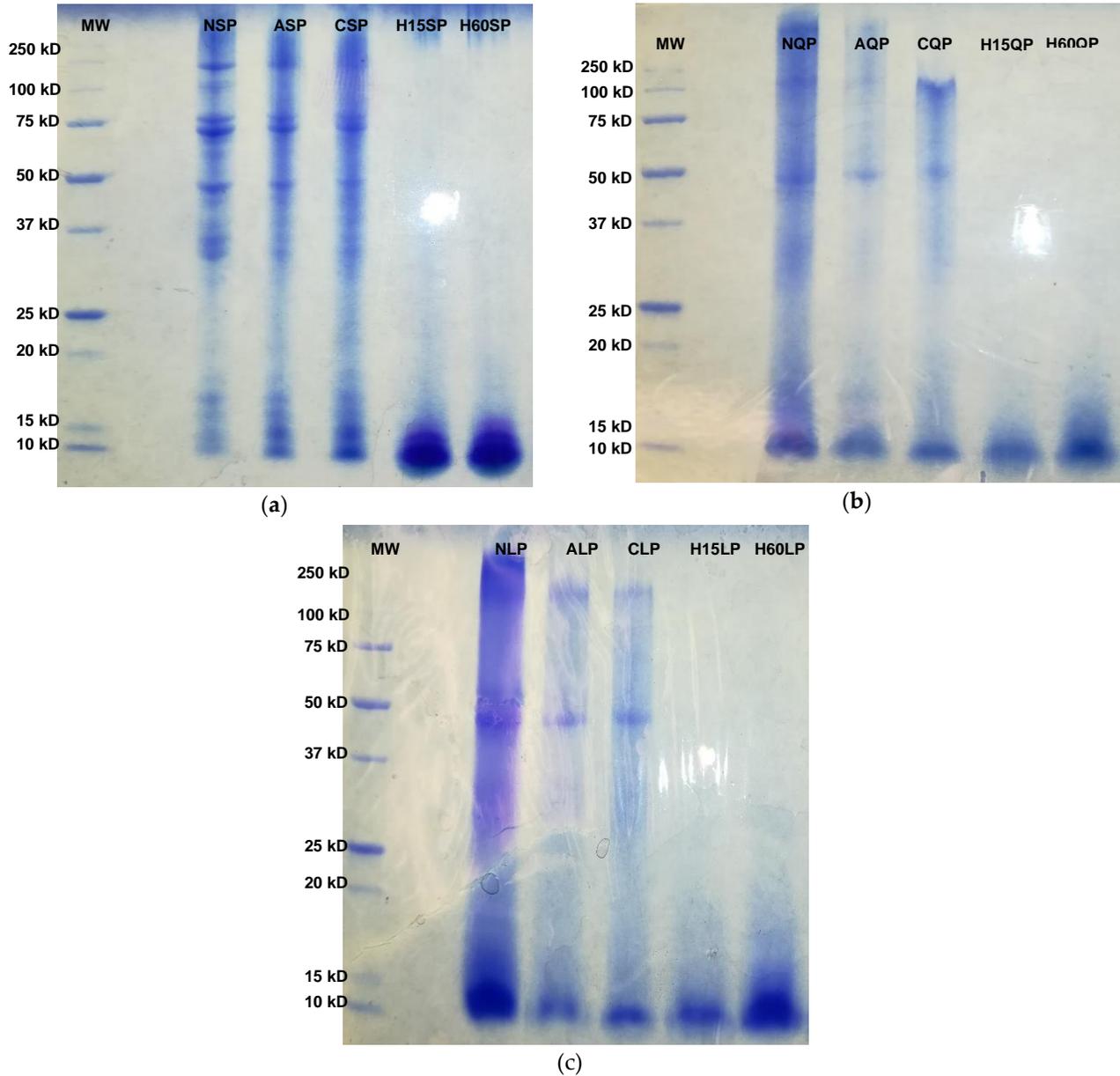


Figura 22. SDS-PAGE de las proteínas de soya (a), quinua (b) y lentejas (c) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática; NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSCP: caseinato de sodio N-catinizado, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min.

Las modificaciones químicas y enzimáticas estudiadas han reportado la capacidad de mejorar propiedades funcionales de las proteínas como la solubilidad, sus capacidades de formación de emulsión y espuma, incremento de la hidrofobicidad y en el poder de hinchamiento; resultados acorde a los obtenidos en el procesos de reprivatización de las proteínas de fuentes vegetales estudiadas (148,158). Las propiedades funcionales como la adsorción de agua (WAC) y de aceite (FAC); el índice de actividad emulsificante (EAI) y la estabilidad de las emulsiones determinadas por el índice de estabilidad emulsificante (ESI) y el potencial Z (ζ_e); y la temperatura de formación de gel (Tgel) de las proteínas nativas y modificadas se muestran en las Tablas 14 a la 16. La WAC y FAC fueron propiedades funcionales que presentaron variaciones debido a las modificaciones estructurales de las proteínas indiferentes a la fuente estudiada.

La WAC en la mayoría de los casos no presento diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las proteínas modificadas y la proteína nativa. No obstante, los procesos de hidrólisis enzimática si presentaron disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para WAC y los procesos de N-cationización presentaron un una tendencia de incremento para WAC en las proteínas modificadas, a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). La FAC por su parte, reportó un incremento con diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para las proteínas modificadas por los procesos tanto químicos como enzimáticos.

En el caso de la hidrólisis enzimática, la disminución WAC es atribuida simplemente a la reducción de la longitud de la cadena molecular de la proteína, lo que genera mayor exposición de las regiones hidrofóbicas de la proteína que disminuye la WAC y a su vez incrementa FAC con valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en todos los casos. Con respecto a la N-cationización, la incorporación de los grupos polares en la estructura de la proteína incrementa su carácter anfifílico, que a su vez afecta la conformación de las proteínas al promover el despliegue de la estructura terciaria, exponiendo más los grupos hidrofóbicos incrustados en la estructura favoreciendo la WAC y FAC (53,54). Finalmente la unión de las cadenas de ácidos grasos a la proteína en el proceso de N-acilación también dio como resultado el incremento de las propiedades anfifílicas de la proteína, lo que explica el incremento de FAC en todas las proteínas modificadas por este proceso químico (53,54).

El EAI, ESI y ζ (E) obtenidos para las proteínas en su estado nativo y modificadas presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Este comportamiento en la estabilización de sistemas coloidales es relacionado con los cambios en la solubilidad, WAC y FAC de las proteínas atribuidas a los cambios estructurales como la reducción de la cadena polipeptídica y la incorporación de grupos hidrofóbicos y polares explicados anteriormente. El caso de las proteínas de soya (Tabla 16) el EAI no presento diferencias estadísticamente significativas entre las proteínas modificadas y la proteína nativa ($p > 0,05$) lo que indica que la capacidad emulsificante de la proteína no fue modificada al ser modificadas, sin embargo, el

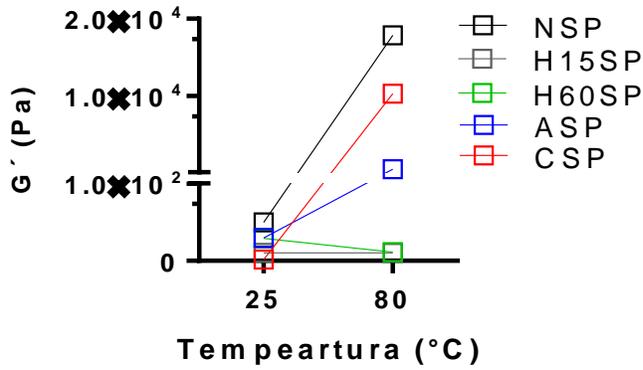
ESI y ζ_e presentaron un incremento con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para ASP, CSP y H15SP comparado con las proteínas nativas (NSP); este último considerado también como factor relacionados con la estabilidad de las emulsiones ya que a valores absolutos de carga superficial (ζ) superiores a ± 30 mV se genera la repulsión de las gotas de aceite en el sistema coloidal y, por lo tanto, a una mejor estabilidad contra la coalescencia (159). H60SP presentó una disminución en los parámetros relacionados con la estabilidad de la emulsión, posiblemente debido al incremento en el grado de hidrólisis, que al romper aún más las cadenas polipeptídicas de la proteína generó cadenas cortas de proteínas hidrolizadas que no pueden envolver eficientemente la gota de aceite, y por ello son menos estables.

Las proteínas de quinua presentaron un comportamiento comparable para EAI con las proteínas de soya (Tabla 16), diferenciando el incremento significativo en EAI para H15QP comparado con NQP y la disminución para H60QP comparado con NQP. En este caso, la hidrólisis enzimática fue una modificación que generó mayor efecto que las modificaciones químicas usadas, posiblemente debido a la diferencia en los bajos porcentajes del grado de modificación (Tabla 13) obtenidos para la quinua entre las diferentes modificaciones y comparado con las otras fuentes de proteínas. La estabilidad de las emulsiones obtenidas con las proteínas de quinua nativas y modificadas presentó un comportamiento comparable con las proteínas de soya descrito anteriormente, sin embargo, la variación es proporcional al grado de modificación, se observó una mayor variación para las proteínas de soya y lentejas que para las proteínas de quinua (Tabla 13).

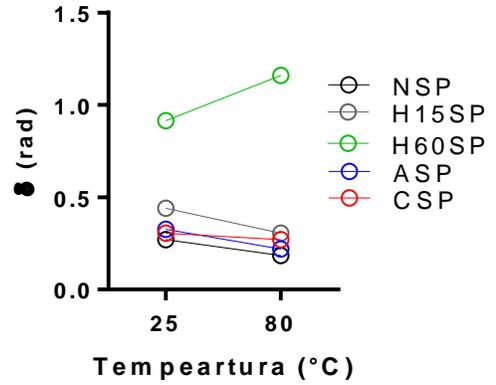
Finalmente, las proteínas de lentejas fueron las proteínas que presentaron menor EAI (Tabla 17) pero mayor estabilidad en las emulsiones, ESI y ζ_e comparada con las proteínas de las otras dos fuentes estudiadas. A pesar de estas diferencias, la tendencia en el comportamiento de los parámetros de EAI, ESI y ζ_e es igual a los descritos previamente con base a los tipos de modificación estudiada.

La temperatura de gelación (T_g) reportada para las proteínas nativas y derivadas de las tres fuentes estudiadas se muestra en las Tablas 15 a la 17. El barrido de temperatura usado para la determinación T_g emplea los módulos de almacenamiento (G') y el ángulo de desfase (δ) como parámetros para definir la temperatura donde se genera el aumento en la movilidad de la estructura de la proteína, promoviendo el cambio de la dispersión de las proteínas a un sistema tipo gel por la formación de enlaces disulfuro e interacciones electrostáticas entre los restos expuestos (140,141). Además, el δ determina la firmeza del gel obtenido. Las T_g de todas las proteínas modificadas por N-cationización y N-acilación incrementó indiferente a la fuente de la proteína, mientras que las proteínas modificadas por hidrólisis enzimática no presentaron la formación de geles (Tablas 15 - 17). El incremento en la T_g de las proteínas modificadas por N-cationización y N-acilación coincide con los resultados obtenidos en los termogramas reportados en la Tabla 14, específicamente en T_{d1} que hace referencia a la temperatura de desnaturalización de las proteínas. La imposibilidad de las fracciones de las moléculas de proteínas hidrolizadas para formar una estructura de red adecuada durante el tratamiento térmico, no permite que las proteínas hidrolizadas formen el gel, este

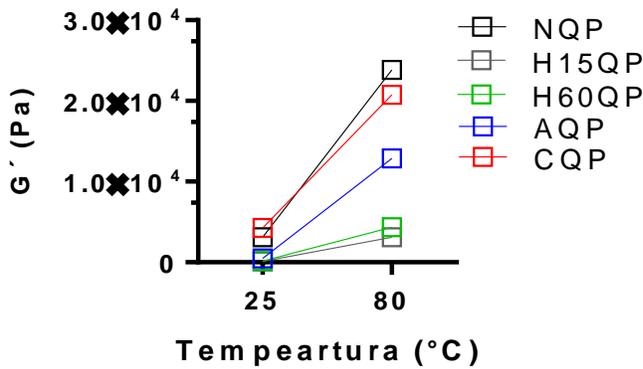
comportamiento ha sido reportada anteriormente para proteínas de otras fuentes vegetales (111). Las Figuras 23 y 24 relacionan los G' y δ en los barridos de temperatura (Figura 23) y barridos de frecuencia (Figura 24) para la formación de los geles de proteína y el espectro mecánico de los geles ya formados, respectivamente.



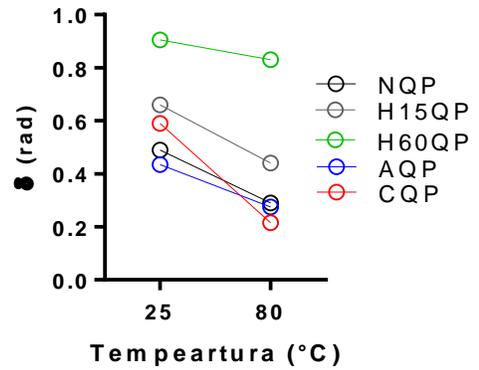
(a)



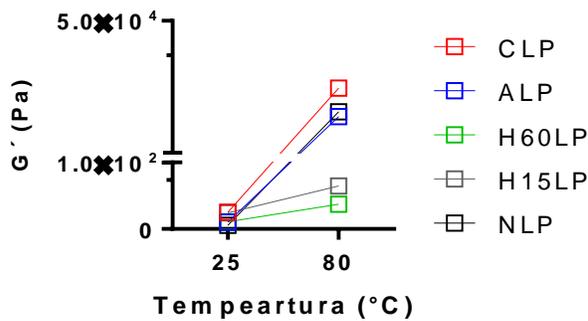
(b)



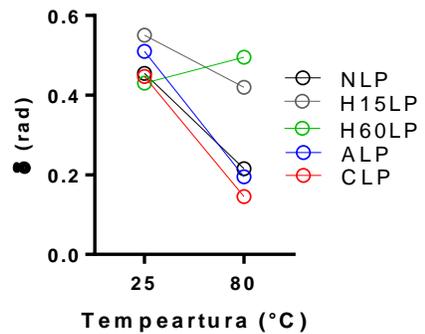
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 23. Módulo de almacenamiento (G') y ángulo de desfase (δ) al inicio y al final del barrido de temperatura para las proteínas de soya (a y b), quinua (c y d) y lentejas (e y f) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática. NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSCP: caseinato de sodio N-catinizado, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min.

Los G' reportados en la Figura 23 muestra como la fracción elástica; representada por G' , incrementa significativamente al aumentar la temperatura de 25 °C a 80 °C para las soluciones de proteínas donde se reportó una T_g . En el caso de las proteínas modificadas por hidrólisis enzimática el G' se mantuvo constante o con leves incrementos en el incremento de la temperatura. El δ presenta una tendencia a disminuir al incrementar la temperatura para las soluciones que reportar T_g , recordando que a menor δ , la estructura gel predomina en el sistema.

La Figura 24 muestra los espectros mecánicos mediante la prueba de barrido de frecuencia para todos los sistemas con capacidad gelificante después del proceso de gelificación. El comportamiento de todos los geles obtenidos son comportamiento de geles débiles, dependientes de la frecuencia, donde G' y δ varían con respecto a la frecuencia angular aplicada. A pesar que los G' mayores son para las proteínas modificadas por N-acilación y N cationización; indiferente a la fuente de proteína estudiada, la resistencia de los geles de las proteínas nativas fueron mayores debido a los valores constante de G' y δ obtenidos a frecuencias angulares de 0.1 y 10 rad/s.

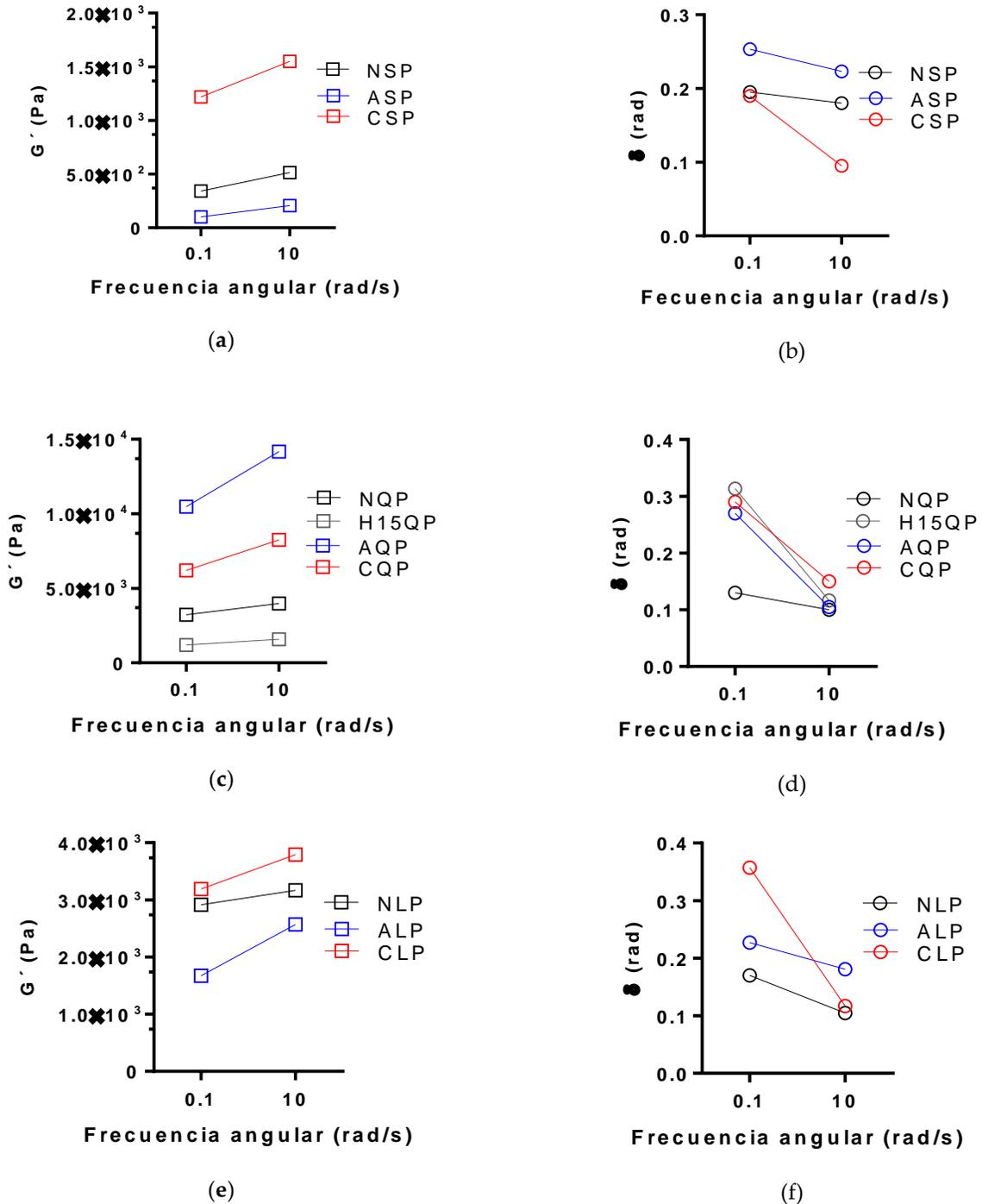


Figura 24. Módulo de almacenamiento (G') y ángulo de desfase (δ) al inicio y al final del barrido de frecuencia para las proteínas de soja (a y b), quinua (c y d) y lentejas (e y f) nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática. NSP: proteína de soja nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soja N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSP: proteína de soja N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soja hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soja

hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min.

6.4.2. Encapsulación por gelación iónica usando las proteínas nativas y modificadas

En la Tabla 18 se muestran los resultados del porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE) del colorante hidrofílico y el extracto de annatto empleando las proteínas nativas y modificadas como materiales de recubrimiento. Los valores máximos de EE obtenidos fueron para el proceso de encapsulación del colorante empleando las proteínas de soya como material de recubrimiento, seguido del proceso de encapsulación del mismo activo empleando las proteínas de lentejas y de quinua, respectivamente. La encapsulación del extracto de annatto presentó menores valores de EE comparado con los procesos de encapsulación del colorante debido a la fracción hidrofóbica que contiene el extracto, disminuyendo la capacidad de recubrimiento del extracto de annatto comparado con el colorante.

Tabla 18. Comparación de la eficiencia de encapsulación de las proteínas de soya, quinua y lentejas nativas y modificadas por N-acilación, N-cationización e hidrólisis enzimática para el extracto de annatto y el colorante hidrofílico.

Fuente	Colorante hidrofílico	Extracto de annatto
	EE (%)	EE (%)
NSP	96,32 ± 0,11 ^{a*}	64,93 ± 0,86 ^{a*}
H15SP	88,03 ± 0,17 ^{b*}	27,49 ± 3,40 ^c
H60SP	39,08 ± 6,11 ^{c*}	14,06 ± 8,17 ^{b*}
ASP	96,23 ± 0,09 ^{a*}	68,91 ± 0,23 ^{a*}
CSP	91,81 ± 2,52 ^{ab*}	65,33 ± 0,96 ^{a*}
NQP	73,63 ± 2,04 ^{a*}	45,77 ± 1,95 ^{a*}
H15QP	21,43 ± 2,05 ^b	19,87 ± 0,77 ^{d*}
H60QP	3,02 ± 3,29 ^c	5,12 ± 0,98 ^c
AQP	88,00 ± 1,47 ^{d*}	55,32 ± 6,68 ^{ab*}
CQP	78,81 ± 0,02 ^{e*}	49,24 ± 3,98 ^{b*}
NLP	80,52 ± 3,82 ^{a*}	63,82 ± 2,17 ^{a*}
H15LP	78,21 ± 0,18 ^{a*}	20,72 ± 1,50 ^{d*}
H60LP	65,58 ± 1,32 ^{b*}	13,88 ± 1,89 ^{c*}
ALP	89,29 ± 0,02 ^{c*}	74,26 ± 2,45 ^{b*}
CLP	87,60 ± 0,43 ^{c*}	66,85 ± 1,86 ^{a*}

Diferentes letras superíndice dentro de las filas indican diferencias significativas entre tipos de proteínas y (*) indica diferencias significativas entre los activos a encapsulados ($p < 0,05$) según LSD-Fisher; los valores se expresan como media ± desviación estándar ($n = 3$). EE: eficiencia de encapsulación, NSP: proteína de soya nativa, NQP: proteína de quinua nativa, NLP: proteína de lentejas nativa, ASP: proteína de soya N-acilada, AQP: proteína de quinua N-acilada, ALP: proteína de lentejas N-acilada, CSP: proteína de soya N-catinizada, CQP: proteína de quinua N-catinizada, CLP: proteína de lentejas N-catinizada, H15SP: proteína de soya hidrolizada 15 min, H60SP: proteína de soya hidrolizada 60 min, H15QP: proteína de quinua hidrolizada 15 min, H60QP: proteína

de quinua hidrolizada 60 min, H15LP: proteína de lentejas hidrolizada 15 min, H60LP: proteína de lentejas hidrolizada 60 min.

En la Tabla 19 se presenta los resultados del análisis de varianza multifactorial realizado para evaluar el efecto de la modificación de la proteína, el activo encapsulado y la fuente de la proteína utilizada sobre la eficiencia de encapsulación (EE). Los resultados evidencian un efecto estadísticamente significativo de los tres factores en su expresión lineal e interacción sobre EE ($p < 0,05$), exceptuando la interacción entre la modificación de proteína y el activo encapsulado la cual no presento efectos estadísticamente significativo ($p=0,053$). Esta excepción puede ser debido a que el incremento en EE es constante para la encapsulación del colorante y la encapsulación del extracto de annatto.

Tabla 19. ANOVA multifactorial sobre la eficiencia de encapsulación de los polifenoles totales y bixina presentes en el extracto de annatto

Fuente	EE (%)
Efectos principales	<i>p-valor</i>
A:Modificación	$\leq 0,001$
B:Activo encapsulado	$\leq 0,001$
C:Fuente de proteína	$\leq 0,001$
AB	0,053
AC	0,006
BC	0,001

En la Figura 25 se muestran los resultados de la comparación de medias de las eficiencias de encapsulación (prueba LSD de Fisher) empleando las tres diferentes proteínas vegetales, el efecto de cada modificación, y la encapsulación del colorante y el extracto de annatto, respectivamente.

En la Figura 25a se puede observar como las proteínas de lentejas y de soya presentan valores mayores de EE comparados con las obtenidas con las proteínas de quínoa, posiblemente atribuidos a la diferencia entre los MW, mayor contenido de SH y mayores capacidades de AW, FAC y EAI reportadas anteriormente para las proteínas de soya y lentejas.

Del mismo modo, al realizar la comparación entre las modificaciones estructurales de las proteínas (Figura 25b) se observó un valor mayor de EE para las proteínas modificadas por N-acilación y N-cationización que las proteínas nativas pero sin diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Sin embargo, las proteínas modificadas por hidrólisis enzimática presentaron valores bajos de EE con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) comparados con las otras dos modificaciones y las proteínas nativas. Este comportamiento posiblemente atribuido a la capacidad de formación de gel de las fracciones proteicas obtenidas que fue discutido en la sección anterior, motivo por el cual, se decidió usar las proteínas en su estado nativo para encapsular por el mecanismo de gelación iónica el extracto de annatto.

Por último, la diferencia de los valores de EE entre los activos encapsulados; colorante hidrofílicos y el extracto de annatto, se observa con claridad en la Figura 25c donde un valor mayor de EE ($p < 0,05$) corresponde al colorante que para el extracto de annatto en el proceso de encapsulación empleando los mismo materiales de recubrimiento.

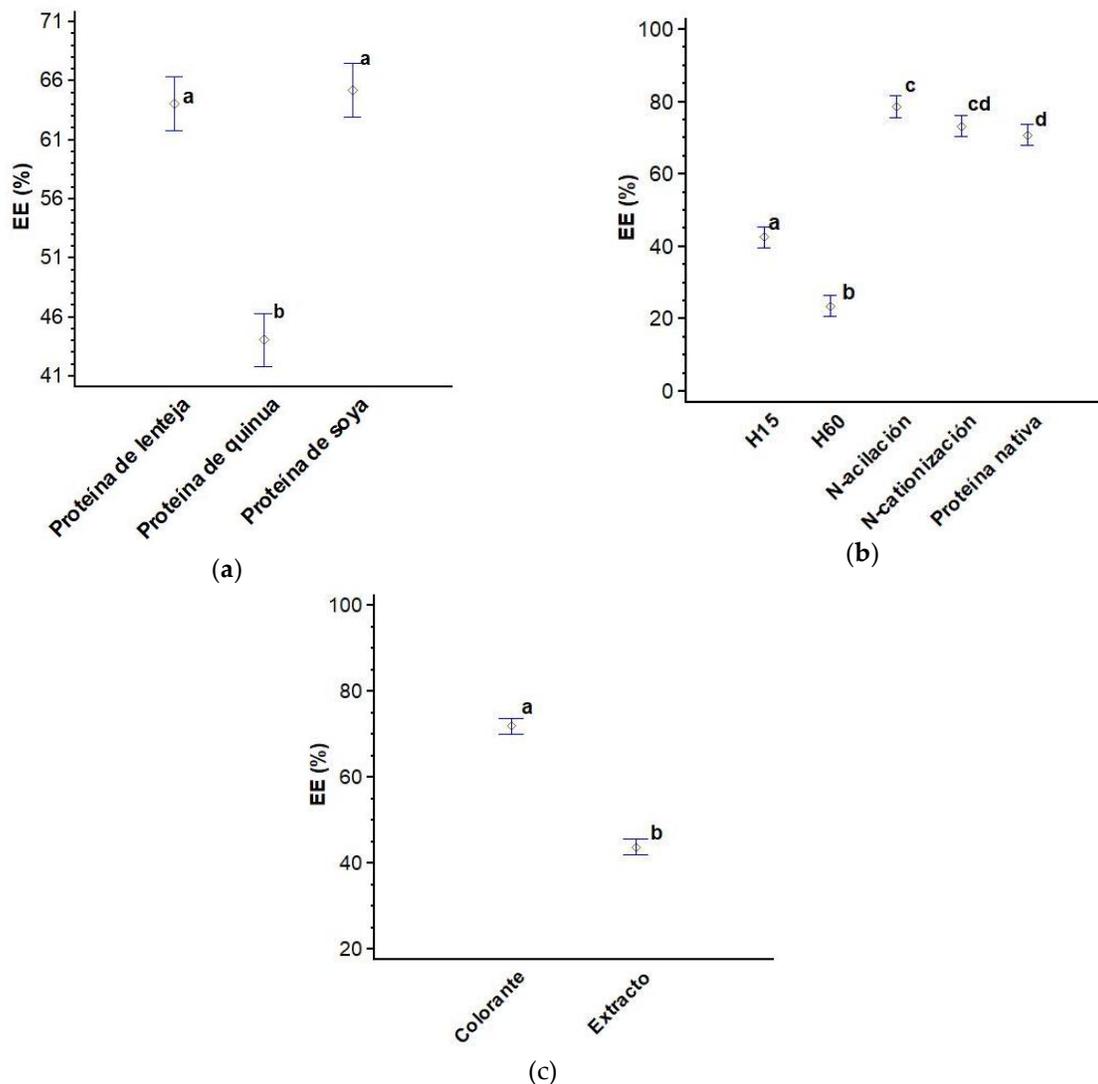


Figura 25. Prueba de LSD de Fisher con un 95% de confianza para: a) Eficiencia de encapsulación (EE) con respecto a la fuente de proteína; b) EE con respecto al mecanismo de modificaciones de las proteínas; c) EE con respecto al activo a encapsular.

Algunos de los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por otros autores; Nesterenko et al. entre 2013 y 2014 reportaron una serie de resultados donde evaluaron la modificación estructural de las proteínas de soya y de semillas de girasol como estrategia para incrementar la eficiencia de encapsulación del α -tocoferol por encapsulado por secado por aspersión (53,54,68,87,160). Aplicaron la hidrólisis enzimática, N-ación y N-cationización

obteniendo resultados positivos en el incremento de las propiedades funcionales de las proteínas y la eficiencia de encapsulación del activo, resaltando que la N-acilación fue la modificación que logro el mayor incremento tanto para proteínas de soya como para proteínas aisladas de las semillas de girasol, pasando de una eficiencia de encapsulación en el estado nativo de 79.7 y 92.6 % para proteínas de soya y de semillas de girasol, respectivamente, a 94.8% y 99.6 para las mismas proteínas modificadas por N-acilación. Comparando los resultados obtenidos en este estudio con los reportados por Nesterenko et al., las eficiencias de encapsulación obtenidas en este estudio fueron mucho menores tanto para las proteínas nativas como modificadas, y las variaciones de EE para las proteínas modificaciones no presentaron diferencias estadísticamente significativas comparadas con las EE logradas por las proteínas nativas, lo cual si ocurrió en lo reportado por Nesterenko et al..

Esta variación es posiblemente atribuida a los métodos de encapsulación empleados, mientras Nesterenko et al. emplearon el secado por aspersión, en este estudio se empleó el proceso de encapsulación por gelación iónica. Por otro lado, comparando los valores de EE obtenidos en los procesos de encapsulación de extractos naturales por gelación iónica usando el alginato de sodio como material de recubrimiento, se han reportado valores de EE comparables con los obtenidos con las proteínas nativo y modificadas usadas en este estudio. Belščak-Cvitanović y compañía en 2018 encapsularon los compuestos bioactivos de la cáscara de cacao, la amapola y el hemp, reportando valores de EE del 73% para partículas de hidrogel de alginato de calcio obtenidas por gelación iónica externa (161). Así mismo, los resultados de Moura y compañía en 2018 (162) quienes obtuvieron valores de EE de polifenoles del extracto de *Sambucus Nigra L* del 74.4 y el 88.5% de partículas obtenidas por gelación iónica externa.

6.5. Encapsulación y estabilidad del extracto de annatto por gelación iónica utilizando proteínas aisladas como material de recubrimiento (Anexo 6).

La eficiencia de encapsulación y el tamaño de partícula (base húmeda y seca) del extracto encapsulado empleando cada proteína como material de recubrimiento se enumeran en la Tabla 20. Las eficiencias de encapsulación presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a las fuentes de proteínas, con valores de eficiencias de encapsulación que variaron entre ~ 58 y 80%. Los valores más grandes de la eficiencia de encapsulación fueron alcanzados cuando se utilizó como material de recubrimiento el caseinato de sodio, seguido por las proteínas de soya, lenteja y quinua. En cuanto al tamaño de las partículas, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los procesos de encapsulación independientemente del contenido de humedad.

Tabla 20. Comparación de la eficiencia de encapsulación y del tamaño de partícula del extracto de annatto encapsulado empleando las diferentes proteínas.

Parámetro		LP	QP	SCP	SP
EE (Bixin)	(%)	68.61 ± 2.38 ^a	58.38 ± 5.55 ^b	79.36 ± 0.82 ^c	71.88 ± 0.97 ^a
Tamaño de partícula en solución	mm	4.00 ± 2.90 ^{a,*}	4.08 ± 3.03 ^a	3.67 ± 0.41 ^a	3.52 ± 2.60 ^a
Tamaño de partícula liofilizada	mm	2.08 ± 1.50 ^{a,*}	2.00 ± 0.96 ^a	2.61 ± 0.94 ^a	2.84 ± 0.79 ^a

Diferentes letras superíndice (a – c) dentro de las filas indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$) según la prueba de diferencia menos significativa de Fisher (LSD-Fisher); Los valores se

expresan como media \pm desviación estándar (DE) ($n = 3$). LP: proteína de lentejas, QP: proteína de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteína de soja, EE: eficiencia de encapsulación. Las muestras marcadas con "*" no son significativamente diferentes entre tratamientos ($p < 0,05$).

Cuando la dispersión de caseinato de sodio se extruye sobre la solución gelificante, éste pierde el sodio que estabiliza su estructura, permitiendo que los restos de fosfoserina y COO^- (ácido glutámico y ácido aspártico) de las proteínas reaccionen con los iones de calcio presentes en la solución gelificante, formando un hidrogel y encapsulando los compuestos bioactivos del extracto de annatto simultáneamente (163). Del mismo modo, las proteínas de origen vegetal utilizan sus aminoácidos ácidos y grupos tiol (cisteína) para formar hidrogeles en presencia de iones de calcio (77). Comparando la suma de los porcentajes de los grupos de fosfoserina y aminoácidos que favorecen la formación de agregados para cada proteína utilizada, encontramos que la proteína de soja (~36,0%) contiene el mayor contenido de aminoácidos que promueve la formación de agregados, seguido por el caseinato de sodio (~32,2%), la proteína aislada de lenteja (~29,3%) y de quinua (~26,0%) (68,164–166). En consecuencia, el material con el mayor contenido de grupos reactivos para la reticulación del polímero, formará un agregado a una velocidad de reacción más alta, con mayor estructura y encapsulando el extracto de manera más eficiente (77). Esto explicaría el mayor porcentaje de encapsulación de la proteína de soja en comparación con las proteínas aisladas de quinua y lenteja. Sin embargo, al comparar los resultados de la proteína de soja y el caseinato de sodio, y a pesar de que este último contiene menos porcentaje de aminoácidos reactivos en el proceso de encapsulación de gelificación iónica, este tuvo una mayor eficiencia de encapsulación que las proteínas de soja, lo cual puede ser debido a la diferencia entre las estructuras secundarias de las proteínas, siendo estas un factor clave en el proceso de encapsulación. Las proteínas de soja, quinua y lenteja son globulares, donde su estructura secundaria está gobernada por la lámina β y la hélice α , y donde muchos de sus aminoácidos están ocultos dentro de la estructura, por lo tanto, la desnaturalización de la proteína es esencial para exponer los aminoácidos necesarios para que puedan reaccionar con los iones Ca^{2+} y de esta manera permitir la formación del agregado (77). Mientras que, la estructura micelar del caseinato de sodio permite que los grupos radicales de sus aminoácidos estén más expuestos permitiéndoles reaccionar más fácilmente con los iones Ca^{2+} presentes en el medio de gelificación (164).

Una vez que las cápsulas de extracto de annatto se obtuvieron mediante el método de gelificación iónica, se evaluaron los espectros FT-IR de las proteínas, del extracto de annatto libre y del extracto encapsulado con los diferentes materiales de recubrimiento (Figura 26). Estos espectros (Figura 26c) confirman la presencia del extracto de semillas de annatto dentro de la cápsula.

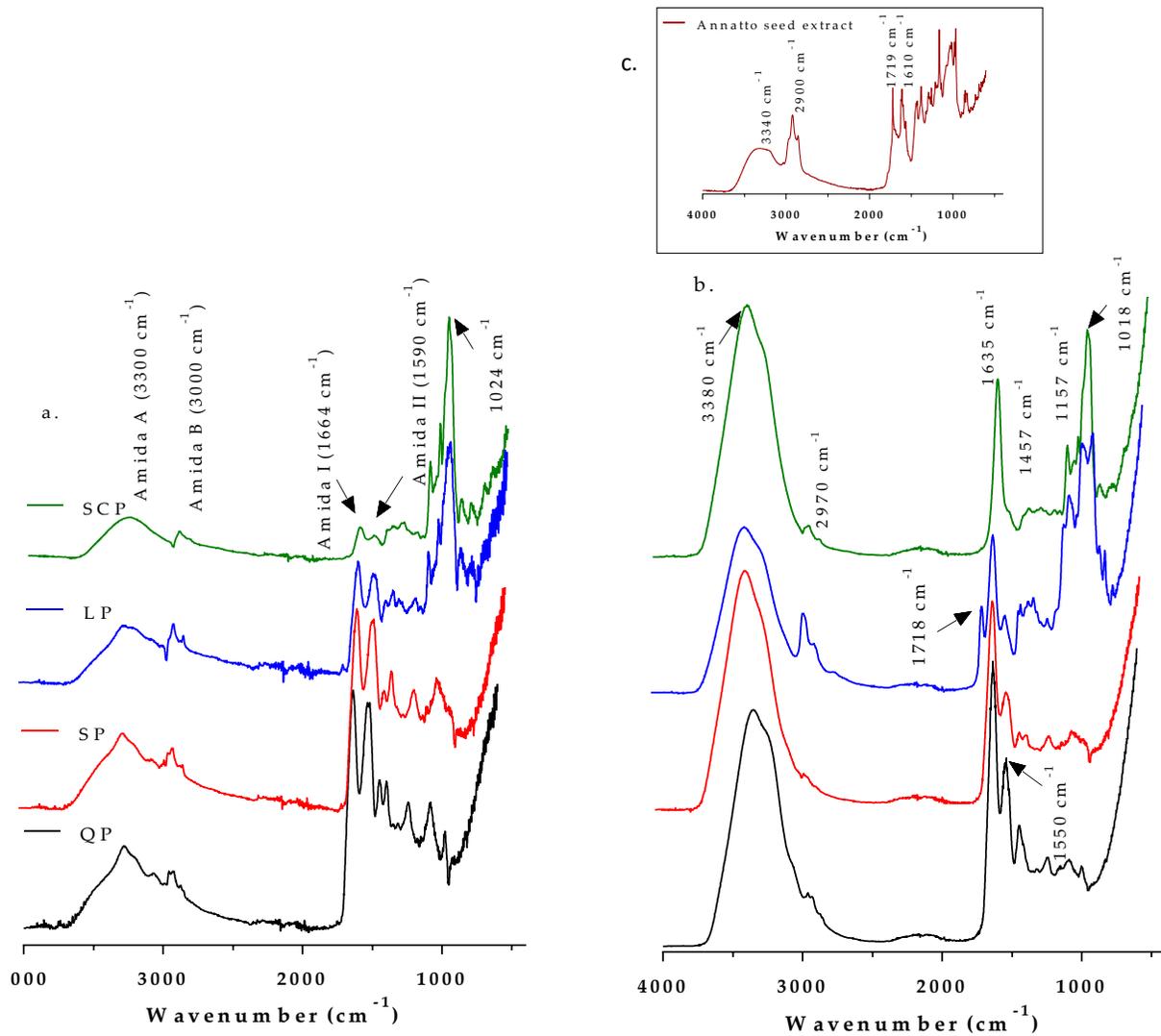


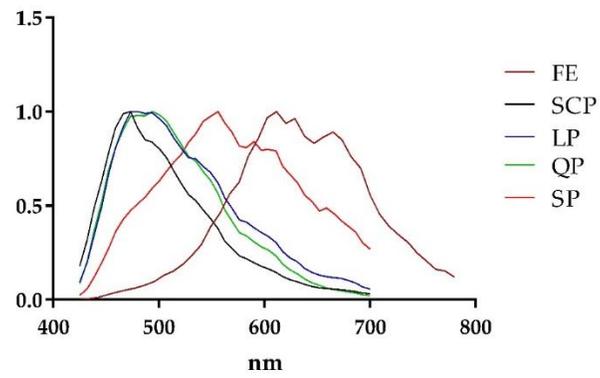
Figura 26. Espectro FT-IR de los diferentes materiales: A. proteínas empleadas como material de recubrimiento, B. extracto de annatto encapsulado con las diferentes proteínas como material de recubrimiento C. extracto de annatto libre. FE: extracto libre, LP: proteína de lentejas, QP: proteína de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteína de soya.

Los espectros FT-IR se obtuvieron para los materiales de recubrimiento (Figura 26a). Primero, la banda ancha observada de emisiones entre 3000 y 3500 cm⁻¹ corresponde a los grupos OH⁻ y NH expuestos y libres de reaccionar con enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares y algunos grupos COO⁻ de aminoácidos en la estructura de la proteína. Los picos característicos correspondientes a la amida I y la amida II dependen de la estructura secundaria de cada proteína y del estiramiento C-N y la flexión plana N-H, respectivamente (150). Se observó que las proteínas de origen vegetal tienen bandas de amida I y II con una intensidad mayor que las del caseinato de sodio, según el análisis de la estructura secundaria previamente planteada. La banda a 1024 cm⁻¹ está formada por la flexión de C-H fuera del plano (de estructuras aromáticas) y el estiramiento PO⁻² o P-OH de los ésteres de fosfato, que están presentes en los residuos de proteínas serina (150). El espectro infrarrojo del extracto

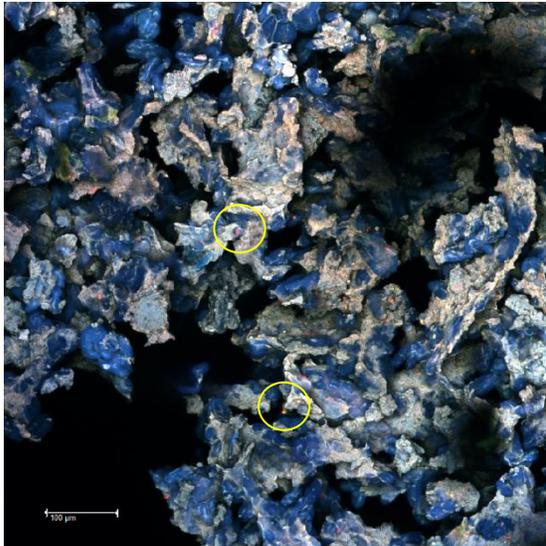
de semilla de annatto sin encapsular (Figura 26c) mostró picos de absorción a 3340 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 1719 cm^{-1} y 1610 cm^{-1} correspondientes a grupos OH, enlaces H-C-H y restos C-O y OH presentes en bixina y compuestos polifenólicos del extracto de semillas de annatto (167). Los espectros infrarrojos del extracto de annatto encapsulado (Figura 26b) demostraron la sinergia entre los espectros infrarrojos obtenidos para cada material de encapsulación y el obtenido para el extracto libre, lo que demuestra que el polvo contenía los compuestos bioactivos del extracto y el material de encapsulación.

De manera paralela, la presencia del extracto protegido dentro de cada material de recubrimiento fue confirmada por las imágenes de microscopía confocal (Figura 27). En la Figura 27a se muestra el espectro de fluorescencia del extracto de semillas de annatto y de los materiales de recubrimiento utilizados para encapsular el extracto, en este se puede evidenciar que el extracto de semilla de annatto muestra un pico con una intensidad máxima entre 600 y 700 nm, mientras que la autofluorescencia en áreas más grandes se identificó como proteína, emitiendo una coloración azul-verde con una intensidad máxima entre 450 y 500 nm para el caso de las proteínas de lenteja y quinua, y entre 500 y 600 nm para la proteína de soya. Con respecto a lo que se puede observar en las imágenes de fluorescencia confocal, las partículas del extracto de semilla de annatto están ampliamente distribuidas e incrustadas dentro de la estructura de la pared y vistas como pequeñas partículas rojas (Figuras 27b-e). La Figura 27b muestra el extracto de semilla de annatto encapsulado con proteína aislada de lentejas, que consiste en una estructura de pequeños hidrogeles irregulares aglomerados, donde el extracto de annatto se distribuye de manera heterogénea en toda la estructura. Por otro lado, las Figuras 27c, 27d y 27e, muestran unas estructuras de gel más densas y más homogéneas, que corresponden al extracto encapsulado con proteínas de quinua, caseinato de sodio y soya, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los reportados en la literatura previa, donde las proteínas globulares se muestran formando geles con superficies irregulares y consisten en agregados de proteínas en forma de esferas (168). Sin embargo, las proteínas de la quinua y la soja pueden formar geles con una polimerización más uniforme con una superficie plana y regular (168–170). Estas características morfológicas obtenidas se confirman en las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostradas en la Figura 28.

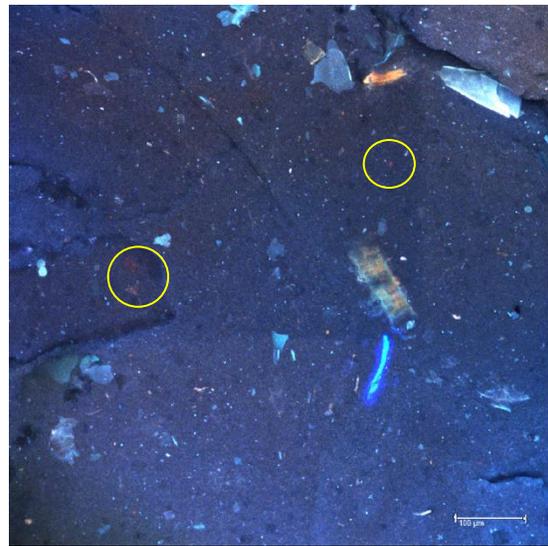
a.



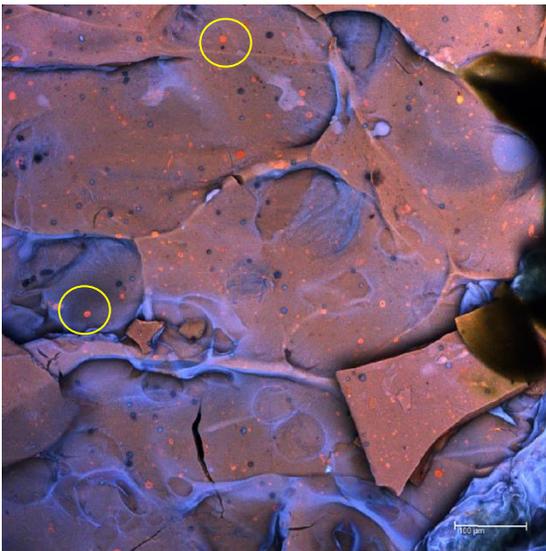
b.



c.



d.



e.



Figura 27. Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) de extracto de annatto libre y encapsulado. A. espectro de fluorescencia; B. extracto encapsulado con proteínas de lentejas, C. extracto encapsulado con proteínas de quinua, D. extracto encapsulado con caseinato de sodio, E. extracto encapsulado con proteínas de soja. FE: extracto libre, LP: proteína de lentejas, QP: proteína de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteína de soja.

El análisis morfológico del extracto de semilla de annatto encapsulado se representa en las imágenes SEM de la Figura 28, en las cuales se observan grandes diferencias en la superficie de las cápsulas obtenidas, de hecho, las proteínas de lentejas (Figura 27a) exhibieron las mayores diferencias morfológicas entre las muestras estudiadas.

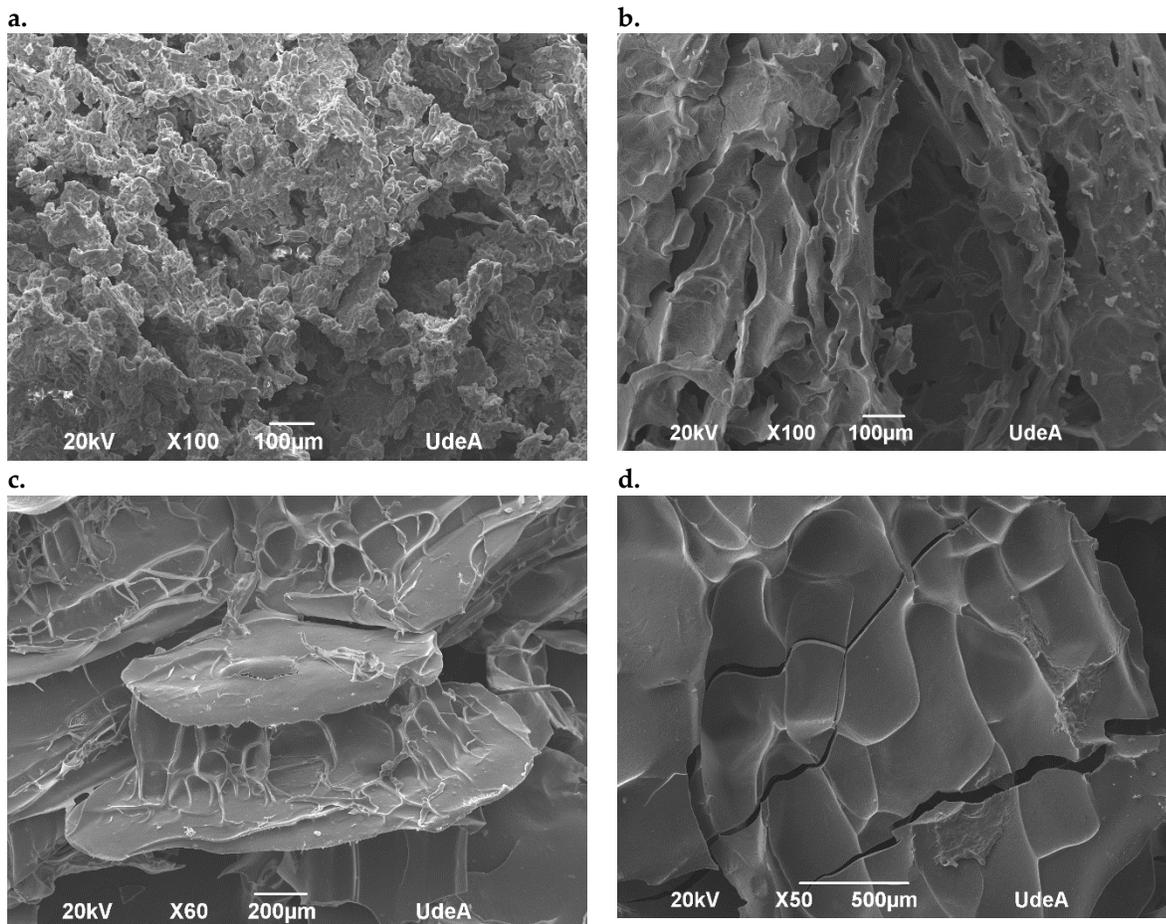


Figura 28. Escaneo de microfotografías electrónicas de extracto de annatto libre y encapsulado: A. extracto encapsulado con proteínas de lentejas, B. extracto encapsulado con proteínas de quinua, C. extracto encapsulado con caseinato de sodio, y D. extracto encapsulado con proteínas de soja.

6.5.1. Estudios de estabilidad del extracto de semilla de annatto encapsulado.

La evaluación de la estabilidad de los compuestos bioactivos (compuestos polifenólicos y bixina) del extracto de semillas de annatto libre y encapsulado se muestra en las Figuras 29 y 30. El contenido de compuestos de polifenoles totales y bixina en el extracto libre permaneció estable a la temperatura de almacenamiento de 4°C, mientras que a 25°C y 65°C el contenido

de compuestos bioactivos disminuyó desde $0,205 \pm 0,008$ hasta $0,114 \pm 0,010$ mg bixina/g a 65°C (Figura 29) y desde $31,25 \pm 7,83$ hasta $12,52 \pm 0,34$ mgAG/g de muestras a 65°C (Figura 30). Por otro lado, los compuestos bioactivos mostraron una menor concentración dentro de las cápsulas, pero se mantuvieron térmicamente estables independientemente del tiempo de almacenamiento estudiado.

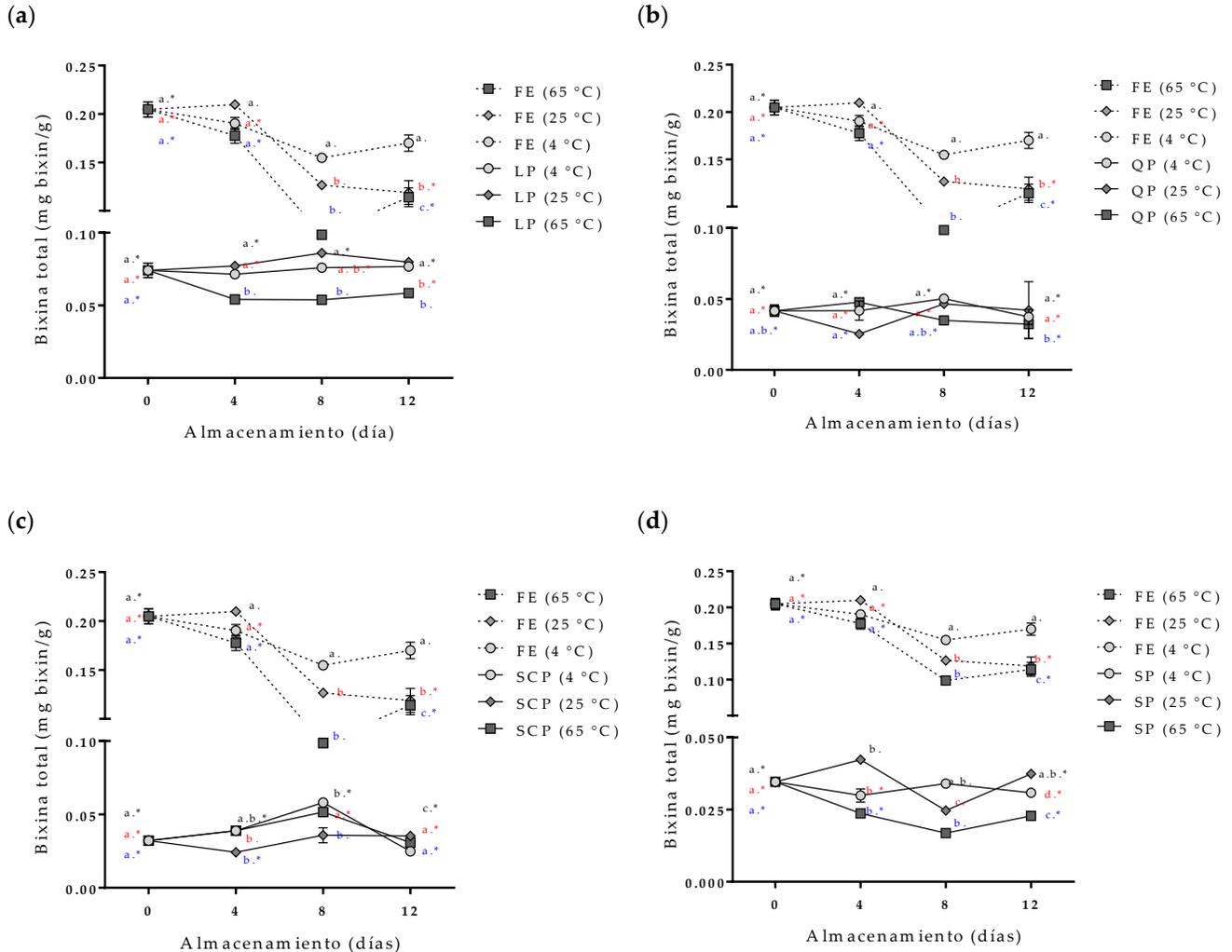


Figura 29. Efecto del tiempo de almacenamiento y la temperatura de la bixina aislado del extracto de annatto libre y encapsulado. (a) Extracto libre y encapsulado con proteínas de lentejas, (b) extracto libre y encapsulado con proteínas de quinua, (c) extracto libre y encapsulado con caseinato de sodio, (d) extracto libre y encapsulado con proteínas de soja. FE: extracto libre, LP: proteínas de lentejas, QP: proteínas de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteínas de soja. * Las muestras marcadas con “*” no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

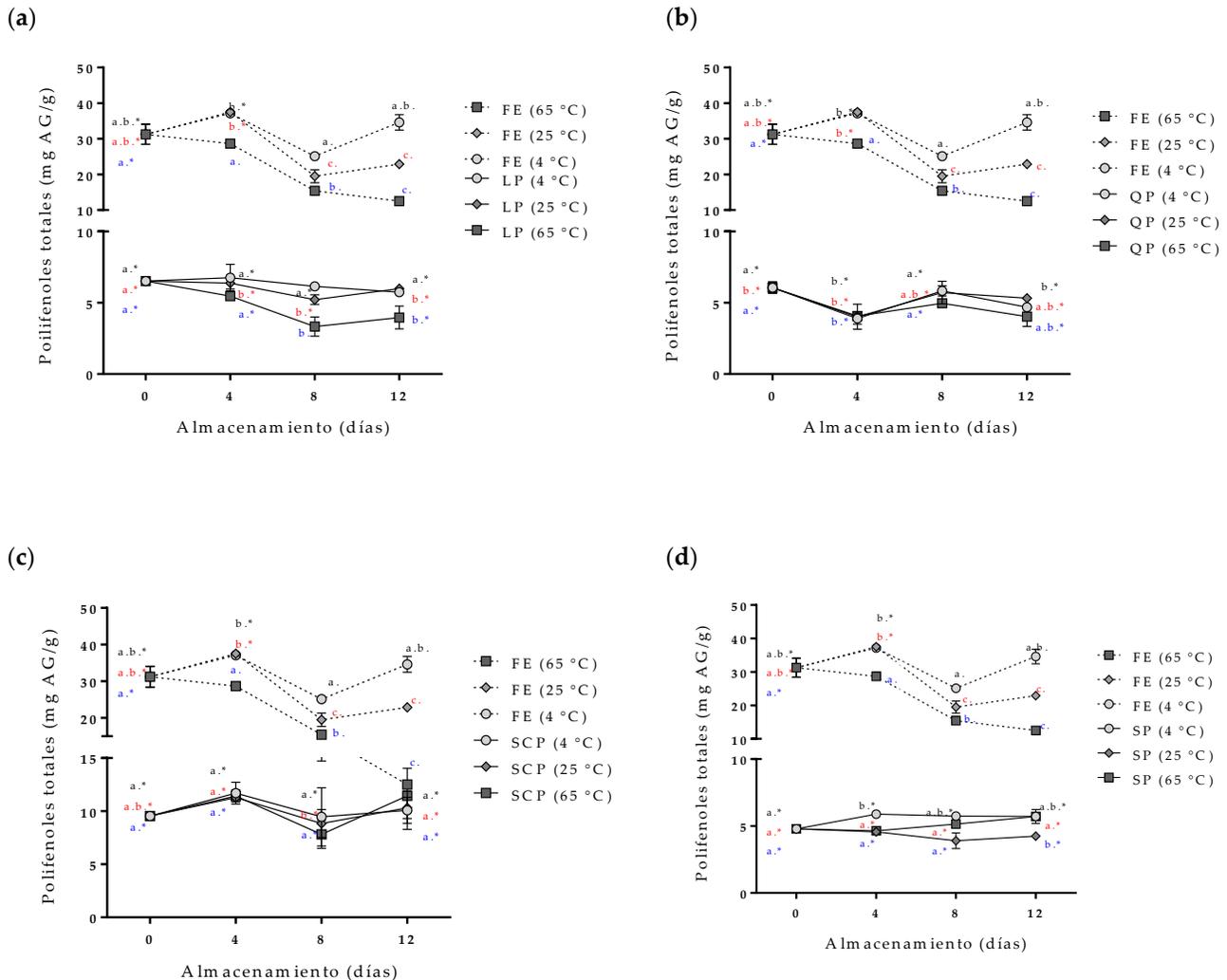


Figura 30. Efecto del tiempo de almacenamiento y la temperatura de los compuestos fenólicos aislados del extracto de annatto libre y encapsulado. (a) Extracto libre y encapsulado con proteínas de lentejas, (b) extracto libre y encapsulado con proteínas de quinua, (c) extracto libre y encapsulado con caseinato de sodio, (d) extracto libre y encapsulado con proteínas de soja. FE: extracto libre, LP: proteínas de lentejas, QP: proteínas de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteínas de soja. *Las muestras marcadas con “*” no son significativamente diferentes en $p < 0,05$.

La estabilidad térmica de los compuestos polifenólicos y bixina del extracto aumentó después de la encapsulación (Figuras 29 y 30). El almacenamiento del extracto libre a una temperatura de 4°C mantuvo los compuestos bioactivos estables, sin embargo, al aumentar la temperatura de almacenamiento a 65°C, se produjo una degradación de los compuestos a ~ 59,95% y ~ 44,33% para los compuestos de bixina y polifenoles, respectivamente. En el caso de las encapsulaciones de extracto, el porcentaje de degradación de los compuestos polifenólicos disminuyó entre ~ 34,00% a ~ 4,05%, siendo la proteína de soja el material de encapsulación que tiene menos estabilidad para estos compuestos y el caseinato de sodio el

que brinda mayor estabilidad. Al comparar las tasas de degradación de los compuestos de polifenoles para las proteínas aisladas de quinua y lenteja, ambos materiales tenían una tasa de degradación cercana al ~ 20,0%. La poca variabilidad y el aumento ligero en el contenido de polifenoles totales en las cápsulas durante el tiempo de almacenamiento (Figura 30) posiblemente se deba a la hidrólisis de los polifenoles conjugados del extracto de semilla de annatto, ya que durante la degradación, se liberan grupos hidroxilo libres, lo que da como resultado un aumento de los resultados del método Folin-Ciocalteu, sensible a los grupos hidroxilo libres (150,171). Este mismo comportamiento se ha informado para otros extractos ricos en compuestos de polifenoles que se han encapsulado con proteínas como materiales de recubrimiento (150,171). La bixina por su parte, logra ser estabilizada con las proteínas usadas como material de recubrimiento, independiente de la fuente de la proteína. El porcentaje de degradación de bixina para el extracto encapsulado con la proteína de lenteja fue ~ 39,17%, siendo el más alto entre los encapsulados, seguido de las capsulas obtenidas con quinua (~ 33,53%), caseinato de sodio (~ 19.9 %) y soya (~ 19.34%). Esto posiblemente se deba a la estructura de la cápsula, donde, a diferencia de los otros materiales de recubrimiento utilizados, tenía una estructura más rugosa y heterogénea que las otras cápsulas (Figura 28a.) formadas por pequeños aglomerados. Esta estructura permite tener mayor área de exposición a condiciones externas, disminuyendo la efectividad de la protección de los compuesto bioactivos.

Por otro lado, las actividades antioxidante y antimicrobiana están estrechamente relacionadas con el contenido de compuestos polifenólicos y bixina presentes en el extracto de annatto (97). La estabilidad de estos compuestos mostró un comportamiento similar con aquellos que tienen actividades antioxidantes y antimicrobianas (Tabla 21 y Figura 31).

Tabla 21. Comparación de la actividad antioxidante del extracto de annatto libre y encapsulado almacenado en diferentes condiciones.

Muestra ($\mu\text{mol Trolox / kg}$)	FE	LP	QP
FRAP D0	157,32 ^a \pm 3,61	8,05 ^a \pm 0,30	8,00 ^a \pm 0,20
FRAP D12 (4°C)	128,08 ^b \pm 14,07	9,74 ^a \pm 1,11	8,82 ^a \pm 3,94
FRAP D12 (25°C)	102,83 ^b \pm 11,57	10,33 ^a \pm 0,47	12,02 ^a \pm 3,12
FRAP D12 (65°C)	73,52 ^c \pm 10,44	5,64 ^b \pm 0,62	8,67 ^a \pm 2,44
SOD D0	13,27 ^a \pm 2,54	2,78 ^a \pm 0,16	3,77 ^a \pm 0,34
SOD D12 (4°C)	12,38 ^a \pm 0,12	2,80 ^{ab} \pm 0,13	2,58 ^{ab} \pm 0,11
SOD D12 (25°C)	8,24 ^b \pm 0,65	4,12 ^{bc} \pm 0,30	4,38 ^{bc} \pm 0,84
SOD D12 (65°C)	5,94 ^c \pm 0,46	3,17 ^c \pm 0,03	2,39 ^c \pm 0,02
Muestra	FE	SCP	SP
FRAP D0	157,32 ^a \pm 3,61	10,49 ^a \pm 0,43	12,56 ^a \pm 0,37
FRAP D12 (4°C)	128,08 ^b \pm 14,07	8,19 ^a \pm 0,24	10,07 ^a \pm 2,12
FRAP D12 (25°C)	102,83 ^b \pm 11,57	10,69 ^a \pm 2,56	10,14 ^a \pm 1,81
FRAP D12 (65°C)	73,52 ^c \pm 10,44	9,94 ^a \pm 3,09	12,08 ^a \pm 1,77
SOD D0	13,27 ^a \pm 2,54	3,87 ^a \pm 0,35	3,29 ^a \pm 0,09
SOD D12 (4°C)	12,38 ^a \pm 0,12	3,42 ^a \pm 0,61	3,98 ^a \pm 0,13
SOD D12 (25°C)	8,24 ^b \pm 0,65	4,02 ^a \pm 0,80	3,37 ^a \pm 0,22
SOD D12 (65°C)	5,94 ^c \pm 0,46	3,85 ^a \pm 0,30	4,52 ^a \pm 1,04

Diferentes letras superíndice dentro de las filas indican diferencias significativas entre las condiciones de almacenamiento ($p < 0,05$) según LSD-Fisher; los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$). FE: extracto libre, LP: proteína de lentejas, QP: proteína de quinua, SCP: caseinato

de sodio, SP: proteína de soya, EE: eficiencia de encapsulación, D0: almacenamiento de día cero, D12: almacenamiento de doce días.

La actividad antioxidante llevada a cabo por los métodos FRAP y SRSA de extractos encapsulados mostró un comportamiento más estable que los obtenidos para el extracto libre, independientemente del material de recubrimiento utilizado. Sin embargo, el poder antioxidante de los extractos encapsulados fue menor que el extracto libre (Tabla 21).

La Figura 31 muestra el efecto del tiempo de almacenamiento y la temperatura sobre la concentración de inhibición de los extractos libres y encapsulados para las dos cepas evaluadas a un porcentaje constante de inhibición (% de inhibición). En el caso del extracto libre, se calculó un IC de 180 mg / L (barras, eje y) para obtener un porcentaje de inhibición del 60% para *S. aureus* y del 90% para *B. cereus* (eje z) para el día cero de almacenamiento. Después de los doce días de almacenamiento a las tres temperaturas estudiadas, el extracto libre almacenado a 4 ° C informó un IC y un porcentaje de inhibición de *S. aureus* y *B. cereus* comparable con el almacenamiento de día cero. Por otro lado, los extractos libres almacenados a 25 ° C y 65 ° C necesitaban aumentar significativamente su concentración para continuar obteniendo porcentajes de inhibición similares al día cero. El extracto libre almacenado a 65 ° C no pudo mantener constante la inhibición de *S. aureus* a pesar de que se incrementó su concentración, una situación que no ocurrió para *B. cereus*. En el caso del extracto encapsulado, el IC para ambos microorganismos exhibió un comportamiento consistente independiente del tipo de proteína utilizada como material portador. Además, los resultados obtenidos mostraron que los porcentajes de inhibición siempre fueron mayores para *B. cereus* que para *S. aureus* para todos los tratamientos.

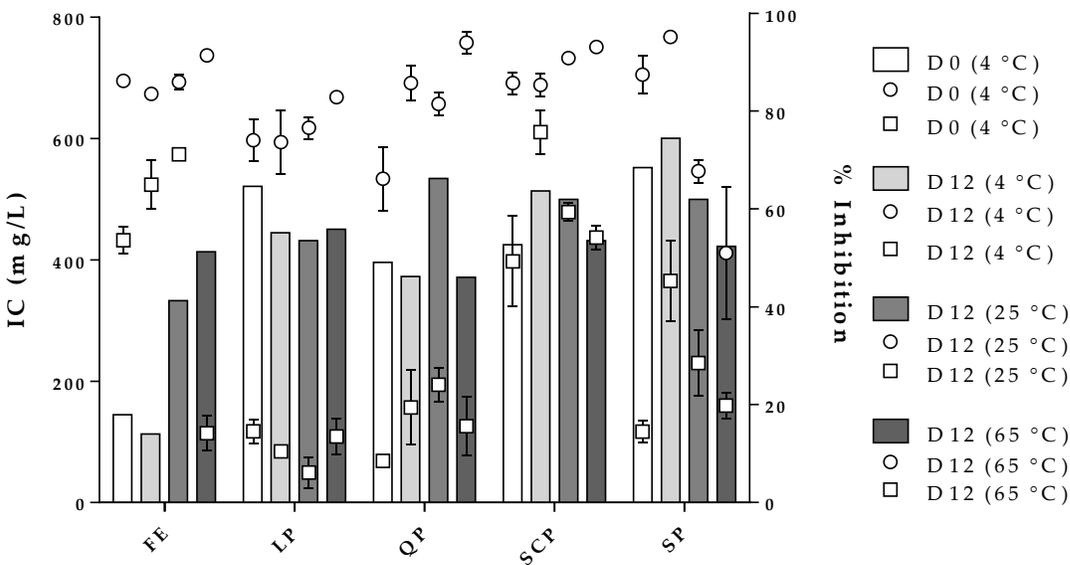


Figura 31. Efecto de las condiciones de almacenamiento en los extractos libres y encapsulados y su influencia sobre la actividad antimicrobiana contra *B. cereus* (○) y *S. aureus* (□). FE: extracto libre, LP: proteínas de lentejas, QP: proteínas de quinua, SCP: caseinato de sodio, SP: proteínas de soja, D0: cero días de almacenamiento, D12: doce días de almacenamiento, IC: concentración de inhibición.

Para la estabilidad de las actividades antimicrobianas (Figura 31) y antioxidantes (Tabla 20) del extracto libre y encapsulado, el extracto libre presentó diferencias significativas en las condiciones de almacenamiento estudiadas, 4°C, 25°C y 65°C. Por otro lado, el extracto encapsulado, indiferente al material de recubrimiento utilizado, presentó una mayor estabilidad para las actividades antioxidantes y antimicrobianas, que estaban estrechamente relacionadas con la estabilidad de los compuestos bioactivos del extracto libre (Figuras 29 y 30). Los resultados de estabilidad de las actividades antimicrobianas y antioxidantes del extracto encapsulado son comparables a los reportados por algunos autores (150,171).

7. CONCLUSIONES

- Las técnicas de extracción MAE y UAE incrementaron el rendimiento de obtención de los compuestos polifenólicos y bixina de las semillas de annatto
- La extracción por UAE no afectó los compuestos bioactivos del extracto de las semillas de annatto con una mayor eficiencia que MAE y favoreció así sus actividades funcionales (antimicrobiana y antioxidante).
- La aplicación de ultrasonido para la extracción de proteínas de quinua, fríjol negro y lentejas demostró ser eficiente en términos de rendimiento de proteínas. Un tratamiento de 37 kHz, 320 W, 20 minutos, un pH de 9 y una relación harina vegetal a solvente de 1: 5 para la quinua y fríjol negro, y 1:10 para las lentejas fueron óptimas.
- La aplicación del ultrasonido en la extracción de proteínas causó una desnaturalización parcial atribuida al efecto de cavitación y la formación de micro-chorros. El peso molecular, el tamaño de partícula, el punto isoeléctrico y los grupos SH no se vieron significativamente afectados por la aplicación de ultrasonido, parámetros relacionados con la estructura primaria de las proteínas. Por el contrario, la temperatura de gelificación, la actividad emulsionante y la adsorción de agua y aceite en proteínas se vieron estadísticamente afectadas por la aplicación de ultrasonido, propiedades funcionales relacionadas con la estructura secundaria de la proteína. Por lo tanto, esta tecnología se sugiere para aumentar el potencial de emulsión y gelificación de las proteínas extraídas de fuentes vegetales y otras propiedades relacionadas a la estructura secundaria.
- La incorporación de Ca^{2+} , el aumento en la concentración de proteína y la disminución del pH cerca del punto isoeléctrico de la proteína, aumentaron el comportamiento elástico de las soluciones independientemente de la fuente de proteína. Sin embargo, el tratamiento térmico y la concentración de proteínas causaron el mayor impacto en el comportamiento reológico de las soluciones proteicas y en la formación de geles, independientemente de la fuente, el pH o los iones Ca^{2+} .



- Los parámetros establecidos para el proceso de encapsulación por gelación iónica empleando proteínas como materiales de recubrimiento son: soluciones de proteína al 10%, a pH de 9.0 (proteínas de quinua, lentejas y soya) o pH 11 (caseinato de sodio) deben ser sometidas a un tratamiento térmico de 80 °C durante 60 min. Posteriormente se debe mezclar la solución proteica y el compuesto activo para ser extruido en una solución de cloruro de calcio al 10%.
- A pesar que las proteínas aisladas de frijól negro presentaron la capacidad de formación de gel por tratamiento térmico, estas no presentaron la capacidad de formación de capsulas por gelación iónica empleando la metodología estandarizada.
- La modificación de las proteínas por los métodos de hidrólisis enzimática, acilación y cationización favorecieron las propiedades funcionales de las proteínas como la solubilidad, la capacidad de adsorción de agua y de aceite, y la capacidad de formación y estabilidad de emulsiones. Esto gracias al incremento de los grupos polares y cadenas de ácidos grasos en la estructura de la proteína.
- La hidrólisis enzimática de las proteínas no favoreció la formación de geles ni la capacidad encapsulante de las mismas por el método de gelación iónica. Por su parte, las modificaciones estructurales de acilación y N-cationización incremento, mas no genero diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) de la eficiencia de encapsulación tanto de compuestos hidrosolubles (colorante artificial) como del extracto de annatto comparada con las obtenidas en las proteínas nativas.
- El uso de proteínas de lentejas y quinua en la encapsulación de extracto de semilla de annatto por método de gelificación iónica demostro que las diferentes proteínas vegetales tienen un efecto significativo ($p < 0,05$) en la eficiencia de encapsulación del extracto. En cuanto a la protección del extracto de semilla de annatto a diferentes temperaturas de almacenamiento, las proteínas lograron proteger y dar estabilidad a las actividades antioxidantes y antimicrobianas del extracto y a los compuestos bioactivos a los que se atribuyeron tales bioactividades, incluso a una temperatura de almacenamiento de 65 ° C por 12 d.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giuliano G, Rosati C, Bramley PM. To dye or not to dye: Biochemistry of annatto unveiled. Trends Biotechnol. 2003;21(12):513–6.
2. Viuda M, Ciro GL, Ruiz Y, Zapata JE, Sendra E, Pérez-Álvarez JA, et al. In vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Annatto (*Bixa orellana* L.) Leaves and Seeds. J Food Saf. 2012;32(4):399–406.
3. Raddatz-Mota D, Mendoza-espinoza F, Rivera-cabrera F, Godoy-herna G. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. J Food Sci Technol. 2017;54(May):1729–41.
4. Quintero Quiroz J, Naranjo Duran AM, Silva Garcia M, Ciro Gomez GL, Rojas Camargo JJ. Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis. Int J Food Sci. 2019;2019:1–9.
5. Butnariu M. Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids

- from *Natural Products*. *J Ecosyst Ecography*. 2016;6(2):1–19.
6. Shahid-ul-Islam, Rather LJ, Mohammad F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *J Adv Res [Internet]*. 2016;7(3):499–514. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>
 7. Zhang H, Xue L, Li B, Tian H, Zhang Z, Tao S. Therapeutic potential of bixin in PM2.5 particles-induced lung injury in an Nrf2-dependent manner. *Free Radic Biol Med [Internet]*. 2018;126(August):166–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584918312905>
 8. Zhang B, Tomita Y, Qiu Y, He J, Morii E, Noguchi S, et al. E74-like factor 2 regulates valosin-containing protein expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(3):536–41.
 9. Martin AM, Ciro G, Zapata J, Vilella J, Perez J, Sayas B. Effect of Date Palm Coproducts and Annatto Extract on Lipid Oxidation and Microbial Quality in a Pork Liver Pâté. *J Food Sci [Internet]*. 2014 [cited 2016 May 17]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.12678/abstract>
 10. Sowbhagya HB, Smitha S, Sampathu SR, Krishnamurthy N, Bhattacharya S. Stability of water-soluble turmeric colourant in an extruded food product during storage. *J Food Eng*. 2005;67(3):367–71.
 11. Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Farhoosh R. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chem [Internet]*. 2014;155:319–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.059>
 12. Alcázar-Alay SC, Osorio-Tobón JF, Forster-Carneiro T, Meireles MAA. Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. *Food Res Int [Internet]*. 2017;99(May):393–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.032>
 13. Taham T, Silva DO, Barrozo MAS. Improvement of bixin extraction from annatto seeds using a screen-topped spouted bed. *Sep Purif Technol [Internet]*. 2016;158:313–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.12.037>
 14. Rodrigues LM, Alcázar-Alay SC, Petenate AJ, Meireles MAA. Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Comptes Rendus Chim*. 2014;17(3):268–83.
 15. Zou T Bin, Jia Q, Li HW, Wang CX, Wu HF. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Mar Drugs*. 2013;11(5):1644–55.
 16. Teng H, Jo IH, Choi YH. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from chinese quince (*Chaenomeles sinensis*) by response surface methodology. *J Appl Biol Chem*. 2010;53(5):618–25.
 17. Da Porto C, Porretto E, Decorti D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem [Internet]*. 2013;20(4):1076–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
 18. Ahmed M, Akter MS, Eun JB. Optimization conditions for anthocyanin and phenolic content extraction from purple sweet potato using response surface methodology. *Int J Food Sci Nutr*. 2011;62(1):91–6.
 19. Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, Jo IH. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J Agric Food Chem*. 2009;57(11):4988–94.
 20. Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR. Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci Technol*. 2015 Jun;
 21. Deng J, Yang H, Capanoglu E, Cao H, Xiao J. Technological aspects and stability of polyphenols. *Polyphenols Prop Recover Appl*. 2018 Jan;295–323.
 22. Ozkan G, Franco P, Marco I De, Xiao J, Capanoglu E. A review of microencapsulation methods for food

- antioxidants: Principles , advantages , drawbacks and applications. *Food Chem* [Internet]. 2019;272(August 2018):494–506. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>
23. Paulo F, Santos L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2017;77:1327–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>
 24. Tupuna DS, Paese K, Guterres SS, Jablonski A, Flôres SH, Rios A de O. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2018;111(July 2017):846–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.001>
 25. Pasin BL. Encapsulación : Caracterización , Preparación Y Aplicaciones En Alimentos Funcionales. 2014;B 11264-20(<http://hdl.handle.net/2445/64943>):359 p.
 26. Parize AL, De Souza TCR, Brighente IMC, De Fávere VT, Laranjeira MCM, Spinelli A, et al. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. *African J Biotechnol*. 2008;7(17):3107–14.
 27. Eun J, Maruf A, Das PR, Nam S. A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze drying A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze drying. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2019;0(0):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1698511>
 28. Barbosa M, Borsarelli C, Mercadante A. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Res Int*. 2005;38(8–9):989–94.
 29. Zhang Y, Zhong Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2013 [cited 2015 Nov 3]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13000581>
 30. Aizpurua-Olaizola O, Navarro P, Vallejo A, Olivares M, Etxebarria N, Usobiaga A. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chem* [Internet]. 2016;190:614–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.117>
 31. Guo J, Monica Giusti M, Kaletunç G. Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency. *Food Res Int*. 2018 Feb;
 32. Anbinder PS, Deladino L, Navarro AS, Amalvy JI, Martino MN. Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. *J Encapsulation Adsorpt Sci*. 2011;1:80–7.
 33. Arriola NDA, Mattos De Medeiros P, Prudencio ES, Maria C, Müller O, Dias De Mello R, et al. Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Biosci*. 2016;13:32–40.
 34. Benavides S, Cortés P, Parada J, Franco W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chem*. 2016;204:77–83.
 35. Kasapis S, Norton IT, Ubbink JB. *Modern Biopolymer Science: Bridging the Divide between Fundamental Treatise and Industrial Application*. 2009. 640 p.
 36. Drusch S, Mannino S. Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2009;20(6–7):237–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.007>
 37. González RE, Tarón A, Morón LB. Formación de Microcápsulas de Tamaño Controlado por Gelación Iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias. *Inf tecnológica*. 2015;26(6):31–8.
 38. Pasin BL, González Azón C, Garriga AM. Microencapsulación con alginato en alimentos. *Técnicas y aplicaciones*. *Rev Venez Cienc y Tecnol Aliment*. 2012;3(1):130–51.

39. de Moura SCSR, Berling CL, Germer SPM, Alvim ID, Hubinger MD. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chem* [Internet]. 2018;241(May 2017):317–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.095>
40. Lupo B, Maestro A, Guti errez JM, Gonz alez C, enez J. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocoll.* 2015;49:25–34.
41. Abaee A, Mohammadian M, Mahdi S. Trends in Food Science & Technology Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2017;70(June):69–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.011>
42. Ben-Harb S, Panoullé M, Huc-Mathis D, Moulin G, Saint-Eve A, Irlinger F, et al. The rheological and microstructural properties of pea, milk, mixed pea/milk gels and gelled emulsions designed by thermal, acid, and enzyme treatments. *Food Hydrocoll.* 2018;77:75–84.
43. Liu F, Chen Z, Tang CH. Microencapsulation properties of protein isolates from three selected *Phaseolus* legumes in comparison with soy protein isolate. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2014;55(1):74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.008>
44. Maurya VK, Bashir K, Aggarwal M. Vitamin D microencapsulation and fortification: Trends and technologies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;196(October 2019).
45. Jannasari N, Fathi M, Moshtaghian SJ, Abbaspourrad A. Microencapsulation of vitamin D using gelatin and cress seed mucilage: Production, characterization and in vivo study. *Int J Biol Macromol.* 2019;129:972–9.
46. Marisa Ribeiro A, Estevinho BN, Rocha F. Microencapsulation of polyphenols - The specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2019;(March):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.011>
47. Vanden Braber NL, Díaz Vergara LI, Rossi YE, Aminahuel CA, Mauri AN, Cavaglieri LR, et al. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *Lwt* [Internet]. 2019;118(October 2019):108844. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643819311867>
48. de Araújo JSF, de Souza EL, Oliveira JR, Gomes ACA, Kotzebue LRV, da Silva Agostini DL, et al. Microencapsulation of sweet orange essential oil (*Citrus aurantium* var. *dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatin mixtures: Preparation, characterization, antimicrobial and antioxidant activities. *Int J Biol Macromol.* 2019;(xxxx):1–9.
49. García-Saldaña JS, Campas-Baypoli ON, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Cantú-Soto EU, Rodríguez-Ramírez R. Microencapsulation of sulforaphane from broccoli seed extracts by gelatin/gum Arabic and gelatin/pectin complexes. *Food Chem.* 2016;201:94–100.
50. Avramenko NA, Chang C, Low NH, Nickerson MT. Encapsulation of flaxseed oil within native and modified lentil protein-based microcapsules. *Food Res Int* [Internet]. 2016;81:17–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.028>
51. Tang CH, Li XR. Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Res Int* [Internet]. 2013;52(1):419–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.010>
52. Jun-xia X, Hai-yan Y, Jian Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem* [Internet]. 2011;125(4):1267–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>
53. Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent

- interventions and their effectiveness. *Ind Crops Prod.* 2013;42(1):469–79.
54. Nesterenko A, Alric I, Violleau F, Silvestre F, Durrieu V. The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2014;41:95–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.017>
 55. Nesterenko A. Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation. University of Toulouse; 2012.
 56. Piornos JA, Burgos Díaz C, Morales E, Rubilar M, Acevedo F. Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation. *Food Hydrocoll.* 2017;63:139–48.
 57. González A, Martínez ML, Paredes AJ, León AE, Ribotta PD. Study of the preparation process and variation of wall components in chia (*Salvia hispanica* L.) oil microencapsulation. *Powder Technol* [Internet]. 2016;301:868–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.07.026>
 58. Nori MP, Favaro-Trindade CS, Matias de Alencar S, Thomazini M, de Camargo Balieiro JC, Contreras Castillo CJ. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2011;44(2):429–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.010>
 59. Chang C, Varankovich N, Nickerson MT. Microencapsulation of canola oil by lentil protein isolate-based wall materials. *Food Chem* [Internet]. 2016;212:264–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.136>
 60. Costa AMM, Nunes JC, Lima BNB, Pedrosa C, Calado V, Torres AG, et al. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. *Food Chem* [Internet]. 2015;168:157–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.016>
 61. de Azevedo LL, Pedrosa C, de Sousa VP, Trindade Pierucci AP, Citelli M. Pea Protein Provides a Promising Matrix for Microencapsulating Iron. *Plant Foods Hum Nutr.* 2013;68(4):333–9.
 62. Li XR, Tang CH. Influence of glycation on microencapsulating properties of soy protein isolate-lactose blends. *J Sci Food Agric.* 2013;93(11):2715–22.
 63. Karaca AC, Nickerson M, Low NH. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chem* [Internet]. 2013;139(1–4):448–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.040>
 64. Karaca AC, Low N, Nickerson M. Encapsulation of Flaxseed Oil Using a Benchtop Spray Dryer for Legume Protein – Maltodextrin Microcapsule Preparation. *Agric food Chem.* 2013;61(21):5148–555.
 65. Mehta SK, Kaur G, Verma A. Fabrication of plant protein microspheres for encapsulation, stabilization and in vitro release of multiple anti-tuberculosis drugs. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2011;375(1–3):219–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.014>
 66. Rascón M, Beristain C, García H. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and soy protein isolate as wall materials. *LWT-Food Sci* [Internet]. 2011 [cited 2017 Feb 6]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810002999>
 67. Tang CH, Li XR. Microencapsulation properties of soy protein isolate: Influence of preheating and/or blending with lactose. *J Food Eng* [Internet]. 2013;117(3):281–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.018>
 68. Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Comparative study of encapsulation of vitamins with native and modified soy protein. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2014;38:172–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.011>
 69. Molina Ortiz SE, Mauri A, Monterrey-Quintero ES, Trindade MA, Santana AS, Favaro-Trindade CS. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein

- isolate. *LWT - Food Sci Technol*. 2009;42(5):919–23.
70. Favaro CS, Santana AS, Monterrey ES, Trindade MA, Netto FM. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2010;24(4):336–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>
 71. Gan CY, Cheng LH, Easa AM. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2008;9(4):563–9.
 72. Kaushik P, Dowling K, McKnight S, Barrow CJ, Adhikari B. Microencapsulation of flaxseed oil in flaxseed protein and flaxseed gum complex coacervates. *Food Res Int* [Internet]. 2016;86:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.015>
 73. Nehete JY, Bhambar RS, Narkhede MR, Gawali SR. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacogn Rev* [Internet]. 2013;7(14):107–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3841988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 74. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J Food Eng* [Internet]. 2010;98(3):309–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.003>
 75. Schmitt C, Turgeon SL. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2011;167(1–2):63–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>
 76. Kharlamova A, Nicolai T, Chassenieux C. Calcium-induced gelation of whey protein aggregates: Kinetics, structure and rheological properties. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2018;79:145–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.049>
 77. Voli M, Paji I, Djordjevi V, Kne Z, Pe I, Stevanovi Z, et al. Alginate / soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. 2018;200(January):15–24.
 78. Ceyhun Sezgin A, Sanlier N. A new generation plant for the conventional cuisine: Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2019;86(November 2018):51–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.039>
 79. Majeed T, Wani IA, Hussain PR. Effect of dual modification of sonication and γ -irradiation on physicochemical and functional properties of lentil (*Lens culinaris* L.) starch. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;101:358–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.110>
 80. Lafarga T, Álvarez C, Bobo G, Aguiló-Aguayo I. Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. *Lwt* [Internet]. 2018;98(July):106–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.033>
 81. Yang Y, He Q, Sun H, Cao X, Elfalleh W, Wu Z, et al. PEGylation may reduce allergenicity and improve gelling properties of protein isolate from black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Biosci* [Internet]. 2018;25(April):83–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.005>
 82. Jafari M, Rajabzadeh AR, Tabtabaei S, Marsolais F, Legge RL. Physicochemical characterization of a navy bean (*Phaseolus vulgaris*) protein fraction produced using a solvent-free method. *Food Chem* [Internet]. 2016;208:35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.102>
 83. Teng Z, Xu R, Wang Q. Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging bioavailability enhancers for nutraceuticals: a review. *RSC Adv* [Internet]. 2015;5(44):35138–54. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA01814E>
 84. Nedovic V, Willaert R. *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology* (Vol. 8). Igarss 2014. 2013. 1-5 p.
 85. Zhang Y, Tan C, Abbas S, Eric K, Zhang X, Xia S, et al. The effect of soy protein structural modification on

- emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2014;120:63–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.006>
86. Carbonaro M, Maselli P, Nucara A. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Res Int* [Internet]. 2014;76:19–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
 87. Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Res Int*. 2012;48(2):387–96.
 88. Tamm F, Herbst S, Brodkorb A, Drusch S. Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2016;58:204–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.032>
 89. Chabanon G, Chevalot I, Framboisier X, Chenu S, Marc I. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochem*. 2007;42(10):1419–28.
 90. Lamsal BP, Jung S, Johnson LA. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Sci Technol*. 2007;40(7):1215–23.
 91. Sobel R, Versic R, Gaonkar A. *Microencapsulation in the food industry*. Vol. 1. 2015. 3-11 p.
 92. Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* [Internet]. 1959 [cited 2017 Aug 8];10(1):63–8. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740100110/full>
 93. FAO/WHO. *Food and Nutrition Paper 25*. Rome. 1982;
 94. Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Res Int* [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 8];44(7):2047–53. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910004357>
 95. Benzie IFF, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* [Internet]. 1996 [cited 2017 Aug 8];239(1):70–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924>
 96. Nurhuda HH, Maskat MY, Mamot S, Afiq J, Aminah A. Effect of blanching on enzyme and antioxidant activities of rambutan (*nephelium lappaceum*) peel. *Int Food Res J* [Internet]. 2013 [cited 2017 Aug 8];20(4):1725–30. Available from: [http://www.ifrj.upm.edu.my/20 \(04\) 2013/31 IFRJ 20 \(04\) 2013 Maskat \(165\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20(04)%202013/31%20IFRJ%20(04)%202013%20Maskat%20(165).pdf)
 97. Quiroz JQ, Torres AC, Ramirez LM, Garcia MS, Gomez GC, Rojas J. Optimization of the Microwave-Assisted Extraction Process of Bioactive Compounds from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*. 2019;8(2):37.
 98. (AOAC) ASFTAM 15°. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). 1998.
 99. Drochioiu G, Ciobanu CI, Bancila S, Ion L, Petre BA, Andries C, et al. Ultrasound-based protein determination in maize seeds. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2016;29:93–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.09.007>
 100. Tontul İ, Kasimoglu Z, Asik S, Atbakan T, Topuz A. Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *Int J Biol Macromol*. 2018;109:1253–9.
 101. Kim HK, Kim YH, Kim YE, Jung SK, Lee NH, Song KM. Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2018;108:12–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.12.002>
 102. Tang CH, Sun X. Physicochemical and structural properties of 8S and/or 11S globulins from mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] with various polypeptide constituents. *J Agric Food Chem*. 2010;58(10):6395–

402.

103. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
104. Tang CH, Ma CY. Heat-induced modifications in the functional and structural properties of vicilin-rich protein isolate from kidney (*Phaseolus vulgaris* L.) bean. *Food Chem* [Internet]. 2009;115(3):859–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.104>
105. Boye JI, Aksay S, Roufik S, Ribéreau S, Mondor M, Farnworth E, et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Res Int* [Internet]. 2010;43(2):537–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>
106. Pearce KN, Kinsella JE. Emulsifying Properties of Proteins- Evaluation of a Turbidimetric Technique.Pdf. 1978;26(3).
107. Zhao YY, Wang P, Zou YF, Li K, Kang ZL, Xu XL, et al. Effect of pre-emulsification of plant lipid treated by pulsed ultrasound on the functional properties of chicken breast myofibrillar protein composite gel. *Food Res Int*. 2014;58:98–104.
108. Esmaeili A, Shokoohi Z. Assessing the effect of oil price on world food prices: Application of principal component analysis. *Energy Policy* [Internet]. 2011;39(2):1022–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2010.11.004>
109. Mu B, Xu H, Li W, Xu L, Yang Y. Spinnability and rheological properties of globular soy protein solution. *Food Hydrocoll*. 2019;90(December 2018):443–51.
110. Caillard R, Remondetto GE, Mateescu MA, Subirade M. Characterization of amino cross-linked soy protein hydrogels. *J Food Sci*. 2008;73(5):283–91.
111. Felix M, Romero A, Guerrero A. Development and evaluation of rheological and bioactive properties of rice protein-based gels. *J Cereal Sci* [Internet]. 2016;72:91–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.10.004>
112. Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci*. 2001;66(5):642–6.
113. Abadía-García L, Castaño-Tostado E, Ozimek L, Romero-Gómez S, Ozuna C, Amaya-Llano SL. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2016;37:84–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
114. Shevkani K, Singh N, Kaur A, Chand J. Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates : A comparative study. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2015;43:679–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.024>
115. Vera A, Valenzuela MA, Yazdani-Pedram M, Tapia C, Abugoch L. Conformational and physicochemical properties of quinoa proteins affected by different conditions of high-intensity ultrasound treatments. *Ultrason Sonochem*. 2019 Mar 1;51:186–96.
116. Karaca AC, Low N, Nickerson M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res Int* [Internet]. 2011;44(9):2742–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
117. Chan E-S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydr Polym*. 2011 Apr;84(4):1267–75.
118. Nur Alam, Nusrat Jahan Bristi MR. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*. 2013;21:143–52.

119. Delgado E, Valverde-Quiroz L, Lopez D, Cooke P, Valles-Rosales D, Flores N. Characterization of Soluble Glandless Cottonseed Meal Proteins Based on Electrophoresis, Functional Properties, and Microscopic Structure. *J Food Sci.* 2019;84.
120. Hosseini SM, Hosseini H, Mohammadifar MA, Mortazavian AM, Mohammadi A, Khosravi-Darani K, et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *Int J Biol Macromol.* 2013 Nov;62:582–8.
121. Quanhong L, Caili F. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chem.* 2005;92(4):701–6.
122. Sinha K, Chowdhury S, Saha P Das, Datta S. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). *Ind Crops Prod* [Internet]. 2013;41(1):165–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.004>
123. Rubio-Senent F, Fernández-Bolaños J, García-Borrego A, Lama-Muñoz A, Rodríguez-Gutiérrez G. Influence of pH on the antioxidant phenols solubilised from hydrothermally treated olive oil by-product (alperujo). *Food Chem.* 2017;219:339–45.
124. Da Costa CLS, Chaves MH. Extração de pigmentos das sementes de *bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Quim Nova.* 2005;28(1):149–52.
125. Novoa Vidal A, Motidome M, Mancini-filho J, Linares Fallarero A, Tanae M, Torres Brando ML, et al. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. *Rev Bras Ciencias Farm.* 2001;37(3):373–82.
126. Campos R, Yamashita F, Cesar F, Zerlotti A. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *J Chromatogr A.* 2011;1218:57–63.
127. Zhang LL, Xu M, Wang YM, Wu DM, Chen JH. Optimizing ultrasonic ellagic acid extraction conditions from infructescence of *platycarya strobilacea* using response surface methodology. *Molecules.* 2010;15(11):7923–32.
128. Ince AE, Sahin S, Sumnu G. Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *J Food Sci Technol.* 2014;51(10):2776–82.
129. Elsohaimy SA, Refaay TM, Zaytoun MAM. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Ann Agric Sci* [Internet]. 2015;60(2):297–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.007>
130. Santiago-Ramos D, Figueroa-Cárdenas J de D, Véles-Medina JJ, Salazar R. Physicochemical properties of nixtamalized black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *Food Chem* [Internet]. 2018;240(February 2017):456–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.156>
131. Li L, Yuan TZ, Setia R, Raja RB, Zhang B, Ai Y. Characteristics of pea, lentil and faba bean starches isolated from air-classified flours in comparison with commercial starches. *Food Chem* [Internet]. 2019;276(September 2018):599–607. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.064>
132. Zhu Z, Zhu W, Yi J, Liu N, Cao Y, Lu J, et al. Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. *Food Res Int* [Internet]. 2018;106(November 2017):853–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.060>
133. Zhu KX, Sun XH, Zhou HM. Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *J Cereal Sci* [Internet]. 2009;50(2):266–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.06.006>
134. Peřsa A, Miedzianka J, Nemš A. Amino acid composition of flesh-coloured potatoes as affected by storage conditions. *Food Chem.* 2018;266(May):335–42.

135. Makri EA, Doxastakis GI. Emulsifying and foaming properties of Phaseolus vulgaris and coccineus proteins. *Food Chem.* 2006;98(3):558–68.
136. Mäkinen OE, Zannini E, Koehler P, Arendt EK. Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the pH value. *Food Chem.* 2016;196:17–24.
137. Ladjal-Ettoumi Y, Boudries H, Chibane M, Romero A. Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Food Biophys.* 2016;11(1):43–51.
138. Sharif HR, Williams PA, Sharif MK, Abbas S, Majeed H, Masamba KG, et al. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants - A review. *Food Hydrocoll.* 2017;11:1–15.
139. Pellegrini M, Lucas-Gonzales R, Ricci A, Fontecha J, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA, et al. Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. *Ind Crops Prod [Internet].* 2018;111(October 2017):38–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.006>
140. Zhu F, Li H. Modification of quinoa flour functionality using ultrasound. *Ultrason Sonochem [Internet].* 2018;(November). Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417718315578>
141. Zhu F. Impact of γ -irradiation on structure, physicochemical properties, and applications of starch. *Food Hydrocoll [Internet].* 2016;52(1):201–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.008>
142. Li S, Yang X, Zhang Y, Ma H, Qu W, Ye X, et al. Enzymolysis kinetics and structural characteristics of rice protein with energy-gathered ultrasound and ultrasound assisted alkali pretreatments. *Ultrason Sonochem [Internet].* 2016;31:85–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.019>
143. Chu L, Yang L, Li J, Lin L, Zheng G. Effect of *Smilax china* L. starch on the gel properties and interactions of calcium sulfate-induced soy protein isolate gel. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2019;135:127–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.130>
144. Mu B, Xu H, Li W, Xu L, Yang Y. Spinnability and rheological properties of globular soy protein solution. *Food Hydrocoll [Internet].* 2019;90(February 2017):443–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.049>
145. Li J, Wu Y, Lu N, Liu D, Regenstein JM, Zhou P. Effects of hydrocolloids on the rheological and microstructural properties of semisolid whey protein-rich systems. *Food Biosci [Internet].* 2019;30(November 2018):100424. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100424>
146. Puppo MC, Añón MC. Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties. *J Food Sci.* 1999;64(1):50–6.
147. Caillard R, Remondetto GE, Subirade M. Physicochemical properties and microstructure of soy protein hydrogels co-induced by Maillard type cross-linking and salts. *Food Res Int [Internet].* 2009;42(1):98–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2008.10.004>
148. Matemu AO, Kayahara H, Murasawa H, Katayama S, Nakamura S. Improved emulsifying properties of soy proteins by acylation with saturated fatty acids. *Food Chem [Internet].* 2011;124(2):596–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.081>
149. Li X, Da S, Li C, Xue F, Zang T. Effects of high-intensity ultrasound pretreatment with different levels of power output on the antioxidant properties of alcalase hydrolyzates from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolate. *Cereal Chem.* 2018;95(4):518–26.
150. Schmidt V, Giacomelli C, Soldi V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. *Polym Degrad Stab.* 2005;87(1):25–31.
151. Meng G, Ma CY, Phillips DL. Raman spectroscopic study of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Chem.* 2003;81(3):411–20.

152. Carbonaro M, Maselli P, Dore P, Nucara A. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. *Food Chem.* 2008;108(1):361–8.
153. Carbonaro M, Maselli P, Nucara A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids.* 2012;43(2):911–21.
154. Molina Ortiz SE, Añón MC. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolates DSC study. *J Therm Anal Calorim.* 2001;66(2):489–99.
155. Sun N xia, Liang Y, Yu B, Tan C ping, Cui B. Interaction of starch and casein. *Food Hydrocoll [Internet].* 2016;60:572–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.029>
156. Jancurová M, Minarovičová L, Dandár A. Quinoa - A review. *Czech J Food Sci.* 2009;27(2):71–9.
157. Bucko S, Katona J, Popovis L, Vactag C, Petrovic L, Vucinice-Vasic M. Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocoll.* 2016;60:271–278.
158. Channasanon S, Graisuwan W, Kiatkamjornwong S, Hoven VP. Alternating bioactivity of multilayer thin films assembled from charged derivatives of chitosan. *J Colloid Interface Sci.* 2007;316(2):331–43.
159. Arancibia C, Riquelme N, Zúñiga R, Matiacevich S. Comparing the effectiveness of natural and synthetic emulsifiers on oxidative and physical stability of avocado oil-based nanoemulsions. *Innov Food Sci Emerg Technol [Internet].* 2017;44(February):159–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.009>
160. Nesterenko A, Alric I, Violleau F, Silvestre F, Durrieu V. A new way of valorizing biomaterials: The use of sunflower protein for α -tocopherol microencapsulation. *Food Res Int [Internet].* 2013;53(1):115–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.020>
161. Belščak-Cvitanović A, Vojvodić A, Bušić A, Keppler J, Steffen-Heins A, Komes D. Encapsulation templated approach to valorization of cocoa husk, poppy and hemp macrostructural and bioactive constituents. *Ind Crops Prod.* 2018 Feb;112:402–11.
162. Aguirre Calvo TR, Perullini M, Santagapita PR. Encapsulation of betacyanins and polyphenols extracted from leaves and stems of beetroot in Ca(II)-alginate beads: A structural study. *J Food Eng.* 2018 Oct;235:32–40.
163. Casanova Y HF, Cardona S. EMULSIONS STABILIZED WITH SODIUM CASEINATE: EFFECT OF CALCIUM IONS, PROTEIN CONCENTRATION AND TEMPERATURE. *Vitae.* 2004;11(1):13–9.
164. SMITH GA, FRIEDMAN M. Effect of Carbohydrates and Heat on the Amino Acid Composition and Chemically Available Lysine Content of Casein. *J Food Sci.* 1984;49(3):817–20.
165. Bhatti RS. Protein subunits and amino acid composition of wild lentil. *Phytochemistry.* 1986;25(3):641–4.
166. Nowak V, Du J, Charrondièrè UR. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chem.* 2016;193:47–54.
167. Rahmalia W, Fabre J-F, Mouloungui Z. Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. *Procedia Chem.* 2015 Jan;14:455–64.
168. Chao W, Wang J, Yan X, Ma W, Wu D, Du M. Effect of partial replacement of water-soluble cod proteins by soy proteins on the heat-induced aggregation and gelation properties of mixed protein systems. *Food Hydrocoll.* 2019;100(May 2019):105417.
169. Kaspchak E, Oliveira MAS de, Simas FF, Franco CRC, Silveira JLM, Mafra MR, et al. Determination of heat-set gelation capacity of a quinoa protein isolate (*Chenopodium quinoa*) by dynamic oscillatory rheological analysis. *Food Chem [Internet].* 2017;232:263–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.014>

170. Mir NA, Riar CS, Singh S. Structural modification of quinoa seed protein isolates (QPIs) by variable time sonification for improving its physicochemical and functional characteristics. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2019;58(April):104700. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104700>
171. Robert P, Gorena T, Romero N, Sepulveda E, Chavez J, Saenz C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *Int J Food Sci Technol*. 2010;45(7):1386–94.

9. ARTICULOS PRODUCTO DE LA INVESTIGACIÓN (ANEXOS)

Anexo 1. Quiroz, J. Q., Torres, A. C., Ramirez, L. M., Garcia, M. S., Gomez, G. C., & Rojas, J. (2019). Optimization of the Microwave-Assisted Extraction Process of Bioactive Compounds from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, 8(2), 37.

Anexo 2. Quintero Quiroz, J., Naranjo Duran, A. M., Silva Garcia, M., Gomez, C., Luz, G., & Rojas Camargo, J. J. (2019). Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis. *International Journal of Food Science*, 2019.

Anexo 3. Isolation, structural characterization, and assessment of functional properties of quinoa, black bean and lentil proteins extracted by ultrasound. *Proceso de prensa en Journal of food science and technology*

Anexo 4. Effect of the concentration, pH, and Ca²⁺ ions on the rheological properties of isolate proteins from quinoa, lentil, and black bean. *Sometido a la revista Foods*

Anexo 5. Effect of the structural modification in vegetable proteins as microencapsulating agents of the achiote seed extract (*Bixa orellana* L.).

Anexo 6. Quintero Quiroz, J., Velazquez, V., Corrales-Garcia, L. L., Torres, J. D., Delgado, E., Ciro, G., & Rojas, J. (2020). Use of Plant Proteins as Microencapsulating Agents of Bioactive Compounds Extracted from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, 9(4), 310.

Anexo 7. Quintero, J., Rojas, J., & Ciro, G. (2018). Vegetable proteins as potential encapsulation agents: a review. *Food Res*, 2(3), 208-220.

Anexo 8. Quintero, J., Naranjo, A., Ciro, G., & Rojas, J. (2017). Vegetable Proteins: Non-sensitizing Encapsulation Agents for Bioactive Compounds. *London, United Kingdom: In Tech*, 43-65.

Anexo 9. Quintero-Quiroz, J., & Rojas, J. (2018). Proteins functionalization: a strategy that boost the performance of these macromolecules for innovative pharmaceutical and food developments. *Vitae*, 25(1), 6-7.