



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FUNCIONALIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE JINICUIL (*Inga jinicuil*) PARA SU USO COMO MATERIAL DE PARED EN LA ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.

PRESENTA

I.I.A. ANA SOFÍA MARTÍNEZ CIGARROA

Para obtener el grado

Maestra en Biotecnología

Director de Tesis
Dra. Delia Esther Páramo Calderón

Co-Director de Tesis
Dr. Lucio Abel Vázquez León

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Noviembre, 2020



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2020/MBt/024
ASUNTO	Asignación de jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 9 de octubre de 2020,

C. ANA SOFÍA MARTÍNEZ CIGARROA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Aurelio Ramírez Hernández	Universidad del Papaloapan	Presidente
Dra. Delia Esther Páramo Calderón	Universidad del Papaloapan	Secretario
Dr. Gerardo Fernández Barbero	Universidad de Cádiz	Vocal
Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello	Universidad del Papaloapan	1er Suplente
Dr. Andrés Aguirre Cruz	Universidad del Papaloapan	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



D. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



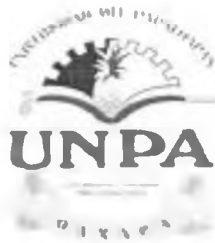
**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

C.c.p. Dra. Delia Esther Páramo Calderón – Director de tesis.
C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Coordinadora de la Maestría en Biotecnología
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2020/MB/039
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 4 de noviembre de 2020

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Ana Sofía Martínez Cigarroa**, matrícula **18140006**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Funcionalización de almidón de jinicuil (*Inga jinicuil*) para su uso como material de pared en la encapsulación de compuestos bioactivos"**, para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima. mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. Adolfo López Torres

Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C c p C. Ana Sofía Martínez Cigarroa – Estudiante
C c p Dra. Delia Esther Páramo Calderón – Directora de Tesis
C c p M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C c p Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial
C.P. 68301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S. N., Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Innovación Tecnológica Sustentable en Materiales y Nanotecnología (LITSUS-MN), y en el Taller de Alimentos de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Delia Esther Páramo Calderón y la codirección del Dr. Lucio Abel Vázquez León. Se contó con la asesoría del Dr. Gerardo Fernández Barbero para el análisis químico mediante cromatografía iónica en el Laboratorio de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, España.

Se contó con la beca CONACyT con número de becario 942304, en el marco del programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131, y también con el apoyo Complementario para Mujeres Indígenas Becarias CONACYT.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CARTA DE RESPONSABILIDAD

Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de tesis **“Funcionalización del almidón de jinicuil (*Inga jinicuil*) para su uso como material de pared en la encapsulación de compuestos bioactivos”** es responsabilidad de los C. Dra. **Delia Esther Páramo Calderón**, Dr. **Lucio Abel Vázquez León** y **Ana Sofía Martínez Cigarroa**, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido aceptados o empleados para el otorgamiento de título, grado diferente o adicional al actual en el país o en el extranjero. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas, y ésta fue examinada por un comité tutorial, conformado por: *Dra. Delia Esther Páramo Calderón, Dr. Lucio Abel Vázquez León y Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello* así como un jurado de examen conformado por: *Dr. Aurelio Ramírez Hernández, Dra. Delia Esther Páramo Calderón y Dr. Gerardo Fernández Barbero* de acuerdo con el Reglamento General de Posgrado vigente, con la finalidad de darle seguimiento al estudiante, así como para validar que es un trabajo de investigación original e inédito.

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 9 de octubre de 2020.

ATENTAMENTE,

Ana Sofía Martínez Cigarroa

Dra. Delia Esther Páramo Calderón

Dr. Lucio Abel Vázquez León



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Delia Esther Páramo Calderón por aceptar ser mi asesora de tesis y ser la guía para la realización de este proyecto, asimismo agradezco su comprensión y apoyo brindado en estos dos años, no sólo profesionalmente, sino también personalmente. Usted hizo que lo complicado fuera más sencillo.

Al Dr. Lucio Abel Vázquez León por ser una pieza fundamental en la realización de esta investigación, usted fue el que me ayudó a comprender toda esta área de conocimiento. Agradezco por la paciencia y dedicación que le brindó a este trabajo de tesis.

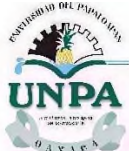
Al Dr. Alejandro Aparicio Saguilán por su apoyo otorgado durante la parte experimental, por los conocimientos y aportaciones brindadas durante el desarrollo de este trabajo, siendo el mentor en el área del almidón.

A Lic. Felipe por siempre estar a mi lado, por siempre tener un “Tu puedes, Sofí”, gracias por formar parte de esta aventura desde el primer día.

A la Ing. Yamel por convertir estos años en una bonita amistad, te agradezco por compartir risas, alegrías, por cada palabra de ánimo intercambiada y por todo tu apoyo brindado durante esta etapa.

A la Ing. Edith por ser mi compañera de viaje en una bonita experiencia que nos tocó vivirla juntas y por el apoyo brindado.

Y a todos los que formaron parte de este trabajo y por el apoyo brindado, gracias.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

DEDICATORIA

***A Dios** por brindarme su amor y bondad infinita, me has permitido disfrutar todos mis logros que son resultado de tu ayuda. Cada momento vivido durante todos estos años, son simplemente únicos, cada mañana me das la oportunidad de empezar de nuevo sin importar mis errores del día anterior. Este trabajo ha sido una gran bendición en todo sentido y lo agradezco, no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.*

Gracias por estar presente no sólo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona.

***A mi Madre** por todos los sacrificios que has hecho por mí, no habrá manera de devolverte todo lo que me has ofrecido, lo único que le pido a Dios es que me regale tiempo para poderte devolver un poquito de lo mucho que me has dado todos estos años. Esta tesis es un logro más que llevé a cabo y sin lugar a duda ha sido en gran parte gracias a ti, por creer en mí y recordarme que los tiempos de Dios son perfectos. Te amo.*

***A Sofía Toledo** por ser el ángel que siempre me acompañó y me acompañará desde el cielo, gracias por siempre creer en mí y nunca juzgarme. Sin duda alguna yo no hubiera logrado nada sin ti, te debó todo.*

***A mis hermanos** por estar siempre presentes aportándome buenas cosas a mi vida, siendo mi mano derecha y creer en mí.*



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ÍNDICE

ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
1 ANTECEDENTES	3
1.1 Encapsulación	3
1.1.1 Definición	3
1.1.2 Morfología de las cápsulas	3
1.1.3 Técnicas de encapsulación	4
1.2 Secado por aspersión	6
1.2.1 Etapas del proceso de secado por aspersión	6
1.2.2 Nano Spray Dryer B-90.....	8
1.2.3 Aplicación del secado por aspersión como técnica de encapsulación	9
1.2.4 Encapsulación de compuestos bioactivos mediante secado por aspersión	9
1.2.4.1 Ácido ascórbico	10
1.3 Materiales de pared utilizados durante el secado por aspersión	10
1.4 Almidón	11
1.4.1 Amilosa	12
1.4.2 Amilopectina	13
1.4.3 Propiedades funcionales del almidón	14
1.4.3.1 Gelatinización	14
1.4.3.2 Retrogradación	15
1.4.4 Fuentes de almidón	15
1.4.4.1 Fuentes convencionales	15
1.4.4.2 Fuentes no convencionales.....	15
1.4.4.3 Semillas de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>) como fuente de almidón.....	16
1.5 Almidón modificado	17
1.5.1 Tipos de modificación aplicados a almidón.....	17
1.5.1.1 Entrecruzamiento.....	18
1.5.1.2 Molienda mecánica de alta energía	19
2 JUSTIFICACIÓN	20
3 HIPÓTESIS	22
4 OBJETIVOS	23



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

4.1	Objetivo general	23
4.1.1	Objetivos específicos	23
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1	Materia prima y reactivos	25
5.2	Aislamiento del almidón	25
5.3	Caracterización del almidón nativo	26
5.3.1	Análisis químico proximal	26
5.3.1.1	Humedad	26
5.3.1.2	Proteínas.....	26
5.3.1.3	Lípidos	27
5.3.1.4	Cenizas.....	27
5.3.2	Características morfológicas	28
5.3.2.1	Microscopía de luz transmitida y luz polarizada	28
5.3.2.2	Microscopía electrónica de barrido.....	28
5.3.2.3	Distribución del tamaño de partícula	29
5.3.3	Propiedades Físicoquímicas	29
5.3.3.1	Perfil de viscosidad.....	29
5.3.3.2	Gelatinización	30
5.3.3.3	Difracción de rayos-X (DRX)	30
5.3.3.4	Contenido de amilosa y amilopectina	31
5.3.3.5	Contenido de almidón total	31
5.3.3.6	Hinchamiento y solubilidad	32
5.3.3.7	Estabilidad en congelamiento-deshielo y refrigeración	32
5.4	Modificación dual del almidón.....	33
5.4.1	Molienda mecánica	33
5.4.2	Entrecruzamiento.....	34
5.5	Caracterización de los almidones modificados.....	34
5.5.1	Características morfológicas	34
5.5.2	Propiedades físicoquímicas.....	34
5.5.2.1	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	35
5.6	Encapsulación mediante secado por aspersión.....	35
5.6.1	Preparación de la mezcla de alimentación.....	35
5.6.2	Secado por aspersión.....	35
5.7	Caracterización de las cápsulas obtenidas	36
5.7.1	Análisis físicoquímicos	36
5.7.1.1	Actividad de agua.....	37
5.7.1.2	Contenido de ácido ascórbico.....	37
5.7.2	Análisis morfológicos	37
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1	Aislamiento del almidón de las semillas de jinicuil	38



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6.2	Caracterización del almidón nativo de las semillas de jinicuil	38
6.2.1	Análisis químico proximal	38
6.2.2	Caracterización morfológica.....	40
6.2.2.1	Microscopía electrónica de barrido, microscopía de luz polarizada y microscopia óptica	40
6.2.2.2	Distribución de tamaño de partícula	42
6.2.3	Propiedades Físicoquímicas	43
6.2.3.1	Perfil de Pasting	43
6.2.3.2	Temperatura de gelatinización	45
6.2.3.3	Difracción de rayos-X (DRX)	46
6.2.3.4	Contenido de amilosa y amilopectina	48
6.2.3.5	Contenido de almidón total	48
6.2.3.6	Hinchamiento y solubilidad	49
6.2.3.7	Estabilidad en congelamiento-deshielo y refrigeración	51
6.2.4	Síntesis de resultados sobre caracterización del almidón de jinicuil	54
6.3	Caracterización de almidones de semilla de jinicuil modificados mediante molienda mecánica	54
6.3.1	Características morfológicas	55
6.3.1.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	55
6.3.1.2	Distribución de tamaño de partícula (DTP).....	56
6.3.2	Propiedades Físicoquímicas	58
6.3.2.1	Perfil de Pasting	58
6.3.2.2	Temperatura y entalpía de gelatinización	62
6.3.2.3	Difracción de rayos X (DRX)	63
6.4	Caracterización de almidones de semilla de jinicuil modificados dualmente	66
6.4.1	Características Morfológicas	66
6.4.1.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	66
6.4.1.2	Distribución de tamaño de partícula (DTP).....	67
6.4.2	Propiedades físicoquímicas.....	68
6.4.2.1	Perfil de Pasting	68
6.4.2.2	Temperatura de gelatinización	70
6.4.2.3	Difracción de rayos X (DRX)	71
6.4.2.4	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	72
6.5	Caracterización de las cápsulas obtenidas mediante secado por aspersión	74
6.5.1	Actividad de agua (<i>aw</i>).....	74
6.5.2	Humedad	75
6.5.3	Análisis morfológicos	75
6.5.3.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	75
6.5.3.2	Distribución del tamaño de partícula (DTP).....	77
6.5.4	Eficiencia de encapsulación de ácido ascórbico y rendimiento del proceso	79
7	CONCLUSIONES	82
8	PERSPECTIVAS	83
	BIBLIOGRAFÍA.....	84



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Características de algunas técnicas de encapsulación.....	5
Tabla 1.2 Materiales de pared utilizados durante el secado por aspersión de productos con fines alimenticios y/o farmacéuticos.	11
Tabla 1.3 Composición química de la semilla de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>)	17
Tabla 6.1 Composición química proximal del almidón nativo de la semilla de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>).....	39
Tabla 6.2 Temperaturas de gelatinización de almidón nativo de la semilla de jinicuil.....	46
Tabla 6.3 Contenido de amilosa, amilopectina y almidón total.	49
Tabla 6.4 Temperaturas de gelatinización de almidones modificados bajo diferentes tratamientos de molienda mecánica de alta energía.....	62
Tabla 6.5 Temperaturas de gelatinización de almidón nativo y modificados de jinicuil.....	71
Tabla 6.6 Actividad de agua y humedad de las capsulas de almidón de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>).....	75
Tabla 6.7 Eficiencia de encapsulación de ácido ascórbico y rendimiento de proceso de secado por aspersión.....	81



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura general de una cápsula (Gharsallaoui et al., 2007).....	3
Figura 1.2 Morfología de diferentes tipos de cápsulas. a) Reservorio, c) d) e) y f) estructuras matriciales, g) multi núcleo y h) multi pared. Adaptado de Gibbs et al., (1999).....	4
Figura 1.3 Etapas del proceso de secado por aspersion (Büchi, 2002; Gharsallaoui et al., 2007).....	7
Figura 1.4 Esquema del Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, 2002).	8
Figura 1.5 Estructura química del almidón (Tomada de Bernal y Martínez, 2006).	12
Figura 1.6 Estructura química de la amilosa. Adaptado de Tester y Karkalas (2002).	13
Figura 1.7 Estructura química de la amilopectina. Adaptado de Tester y Karkalas (2002).	14
Figura 5.1 Metodología general propuesta en el presente proyecto de investigación.	24
Figura 5.2 Secador por aspersion a escala laboratorio BÜCHI, Micro Spray Dryer B-290.....	36
Figura 6.1 Imágenes de microscopía electrónica de barrido del almidón nativo de la semilla de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>).	41
Figura 6.2 Imágenes de microscopía óptica de almidón nativo de la semilla de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>): A) campo claro y B) luz polarizada.	41
Figura 6.3 Distribución del tamaño del gránulo del almidón nativo de semillas de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>).	42
Figura 6.4 Perfil de viscosidad del almidón nativo de la semilla de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>).	44
Figura 6.5 Patrón de difracción de rayos-X del almidón nativo de las semillas de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>).	47
Figura 6.6 Poder de hinchamiento del gránulo de almidón de jinicuil.....	50
Figura 6.7 Porcentaje de solubilidad del granulo de almidón.	51
Figura 6.8 Porcentaje de sinéresis del almidón de jinicuil. a) Refrigeración y b) Congelación.....	53
Figura 6.9 <i>Microscopia electrónica de barrido de almidones modificado por molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y diferentes tiempos</i>	56
Figura 6.10 Distribución del tamaño del gránulo de almidones nativos y modificados de semillas de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>) mediante molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y diferentes tiempos.....	57
Figura 6.11 Perfil de viscosidad de almidones modificados de semillas de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>) mediante molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y bajo diferentes tiempos.....	61



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Figura 6.12 Patrón de difracción de rayos X de almidones modificados de semillas de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>) mediante molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y diferentes tiempos.	65
Figura 6.13 Microscopía electrónica de barrido de almidones modificados (a) almidón nativo (b) almidón modificado por molienda (c) almidón entrecruzado (d) almidón dualmente modificado.	67
Figura 6.14 Distribución de tamaño de partícula de almidones nativos y modificados de la semilla de jinicuil.	68
Figura 6.15 Perfil de viscosidad de los almidones modificados.	69
Figura 6.16 Patrón de difracción de rayos X de almidón modificado de semillas de jinicuil (<i>Inga jinicuil</i>) mediante entrecruzamiento, molienda y dualmente.	72
Figura 6.17 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier del agente entrecruzante, del almidón nativo y de los almidones modificados.	73
Figura 6.18 Microscopía electrónica de barrido de capsulas obtenidas con diferentes materiales de pared (a) almidón nativo (b) almidón modificado molienda mecánica (c) almidón modificado por entrecruzamiento (d) almidón modificado dualmente.	77
Figura 6.19 Distribución de tamaño de partícula de las capsulas de material de pared de almidón nativo y modificados.	78



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESUMEN

La encapsulación es una técnica usada generalmente para proteger compuestos bioactivos de las condiciones ambientales externas adversas. Puede mejorar su estabilidad, aumentando la vida útil y permitiendo su liberación en un entorno dado bajo condiciones controladas. El secado por aspersion es la tecnología de encapsulación más utilizada en la industria alimentaria debido no sólo a su eficiencia, sino también a la posibilidad de producción continua, escalamiento e industrialización, y que es apropiado para materiales termosensibles. Esta técnica requiere de un material de pared, como el almidón, el cual es uno de los biopolímeros más utilizados como material de pared debido a que puede modificarse para producir materiales con características específicas. El objetivo de este trabajo fue obtener almidón de la semilla del jinicuil (*Inga jinicuil*) modificado mediante molienda de alta energía y entrecruzamiento químico, para evaluar su uso como material de pared en la encapsulación de compuestos bioactivos mediante secado por aspersion. Las semillas de jinicuil contienen almidón con una pureza de 76.71 ± 1.54 g/100 bs, pero con un alto contenido de proteínas (20.93 ± 1.54 g/100 bs). Los gránulos de almidón nativo presentaron superficies lisas sin grietas, formas ovoides-esféricas y tamaños heterogéneos ($<1 \mu\text{m} - 40 \mu\text{m}$). El almidón de jinicuil exhibió un patrón de difracción de rayos X de tipo A con una cristalinidad relativa del 23%. Las modificaciones física y química evaluadas afectaron las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales del almidón. Las condiciones de secado por aspersion fueron: temperaturas de entrada y salida, 140 y 70 °C; concentración de sólidos, 20% (m/v); proporción material de pared:ácido ascórbico, 4:1 (m/m). La mayor eficiencia de encapsulación se alcanzó empleando el almidón nativo como material de pared puesto que ocurre la formación de agregados esféricos debido a su contenido de proteína. El mayor rendimiento de proceso se consigue con el almidón modificado mediante molienda mecánica, debido a que se logra disminuir la viscosidad de la mezcla de alimentación con respecto al resto de los materiales evaluados. El tamaño de las microcápsulas obtenidas es directamente proporcional al tamaño de partícula y viscosidad del material de pared utilizado. Se demostró que el almidón nativo de jinicuil y sus modificaciones evaluadas poseen propiedades potenciales para su aprovechamiento como material de pared.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ABSTRACT

Encapsulation is a technique generally used to protect bioactive compounds from adverse external environmental conditions. It can improve its stability, increasing shelf life and allowing its release in a given environment under controlled conditions. Spray drying is the most widely used encapsulation technology in the food industry due not only to its efficiency, but also to the possibility of continuous production and easy expansion and industrialization and that it is appropriate for heat-sensitive materials. This technique requires a wall material, as the starch, which is one of the most widely used biopolymers as wall material because it can be modified to produce materials with specific characteristics. The objective of this work was to obtain modified starch from the seed of jinicuil (*Inga jinicuil*) by high energy milling and chemical crosslinking, to evaluate its use as wall material in the encapsulation of bioactive compounds by spray drying. Jinicuil seeds contains starch with a purity of 76.70 ± 2.67 g/100 db, but with a high content of protein (20.93 ± 2.67 g/100 db). Starch granules presented smooth surfaces with no cracks, oval-spherical shapes and heterogeneous sizes ($<1 \mu\text{m} - 40 \mu\text{m}$). Jinicuil starch exhibited a A-type X-ray diffraction pattern with a relative crystallinity of 23%. The physical and chemical modifications evaluated affected the physicochemical, morphological and structural properties of the starch. Drying conditions were: inlet and outlet temperatures, 140 and 70 °C, respectively; solids concentration, 20% (m/v); wall material:ascorbic acid ratio, 4:1 (m/m). The highest encapsulation efficiency was achieved using native starch as wall material since the formation of spherical aggregates occurs due to its protein content. The highest process performance is achieved with the modified starch by mechanical grinding, since it is possible to reduce the viscosity of the feed mixture with respect to the rest of the evaluated materials. The size of the microcapsules obtained is directly proportional to the particle size and viscosity of the wall material used. It was shown that the native starch of jinicuil and its evaluated modifications have potential properties for its use as wall materials.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

Con base en la gran cantidad de estudios disponibles sobre la composición de los alimentos, se puede afirmar que durante los últimos años se ha visto un avance importante en el conocimiento sobre la relación entre la alimentación y la salud, lo cual ha llevado a la identificación de determinados componentes de la dieta como factores potenciales implicados en la prevención de procesos patológicos, o que promueven el funcionamiento fisiológico del organismo, los cuales se han denominado como compuestos bioactivos. Estos compuestos se encuentran generalmente en pequeñas cantidades en productos de origen vegetal. Sin embargo, una vez extraídos del material vegetal, su estabilidad se ve afectada por la luz, oxígeno, temperatura, humedad y/o pH, provocando su degradación. Una alternativa a esta problemática es la encapsulación, la cual consiste en formar una barrera entre el medio ambiente y los compuestos bioactivos, esto incrementa su estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento.

Hay diferentes técnicas para encapsular los compuestos bioactivos, pero de todas las técnicas, la más utilizada en la industria de los alimentos es el secado por aspersion debido a su operación continua y facilidad de industrialización, además presenta bajos costos operativos en comparación con otras técnicas y se reporta como adecuada para materiales termosensibles (Nedovic *et al.*, 2011). Durante este proceso, la evaporación del disolvente es rápida, y la encapsulación del compuesto dentro del material de pared ocurre casi instantáneamente. La eficiencia de encapsulación dependerá en gran parte del material de pared seleccionado. Por lo tanto, es necesario seleccionar adecuadamente los materiales de pared que serán utilizados en combinación con las condiciones adecuadas de operación. Los criterios para seleccionar los materiales de pared están basados en su costo y sus propiedades fisicoquímicas, como la capacidad de formación de pared, alta solubilidad en el disolvente de trabajo, baja viscosidad a concentraciones altas, temperatura de transición vítrea/fusión y porcentaje de cristalinidad (Singh *et al.*; 2007).

Debido a los retos que representan los avances en la industria de alimentos y la incorporación de compuestos bioactivos, existe una búsqueda constante de nuevos materiales con propiedades adecuadas para su aplicación como materiales de pared durante el secado por aspersion; entre los más utilizados se incluyen proteínas, lípidos, gomas y carbohidratos. El almidón es uno de los biopolímeros más utilizados como material



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

de pared durante el secado por aspersión, sin embargo, en su estado nativo presenta limitaciones técnicas debido al tamaño de su gránulo y su viscosidad alta a bajas concentraciones. Una alternativa eficaz para mejorar dichas propiedades consiste en realizar modificaciones químicas (entrecruzamiento) y físicas (molienda mecánica) al almidón nativo, el entrecruzamiento permite reforzar la estructura del granulo. Debido a estos cambios se puede obtener una mayor tolerancia a altas temperaturas, mayor soporte al esfuerzo cortante, a condiciones ácidas y además lo hace resistente a la digestión enzimática con el fin de producir materiales de encapsulación con un propósito específico. La molienda mecánica permite la disminución de la cristalinidad y la viscosidad, así como el aumento de solubilidad y del poder de hinchamiento (Tan et al, 2015). Sin embargo, en ocasiones una sola modificación no brinda las características requeridas para la encapsulación y es necesario realizar modificaciones duales para conseguir una baja viscosidad y una alta solubilidad. El objetivo de este trabajo es obtener almidón de jinicuil (*Inga jinicuil*) modificado dualmente para usarlo como material de pared en la encapsulación de compuestos bioactivos.

1 ANTECEDENTES

1.1 Encapsulación

1.1.1 Definición

La encapsulación se define como un proceso en el que pequeñas partículas de sustancias bioactivas están rodeadas por un material formador de pared, o que están incrustadas en una matriz homogénea o heterogénea, con el fin de propiciar la formación de cápsulas con propiedades útiles (Días *et al.*, 2015). El contener sustancias encapsuladas dentro de una matriz se realiza con el objetivo de impedir su pérdida o mejorar su estabilidad fisicoquímica, para protegerlas de la reacción con otros compuestos presentes en el medio, o para protegerlos de factores externos impidiendo que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno; además, permite promover la fácil manipulación y dosificación, controlar la liberación durante el momento de su aplicación y mejorar las propiedades sensoriales y/o funcionales de los productos en los que son aplicados (Fuchs *et al.*, 2006).

1.1.2 Morfología de las cápsulas

Las cápsulas están compuestas por dos elementos, el “núcleo”, donde se encuentra la sustancia encapsulada ó el compuesto bioactivo, y el recubrimiento denominado “material de pared”, material de soporte o agente encapsulante (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La Figura 1.1 representa la estructura general de una cápsula.

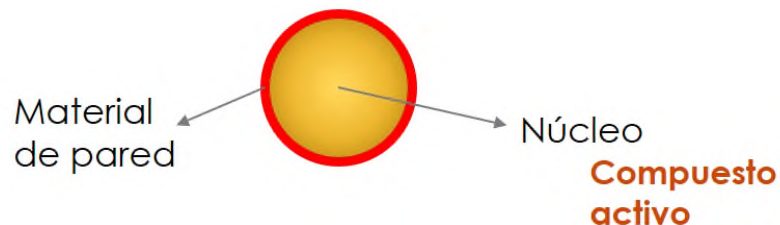


Figura 1.1 Estructura general de una cápsula (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Las cápsulas pueden presentar diferentes morfologías a las cuales se les atribuye un nombre por la forma particular que estas presentan. Las cápsulas se clasifican como: a)

Reservorio, c) d) e) y f) estructuras matriciales, g) multi núcleo y h) multi pared (Gibbs *et al.*, 1999) representado en la Figura 1.2

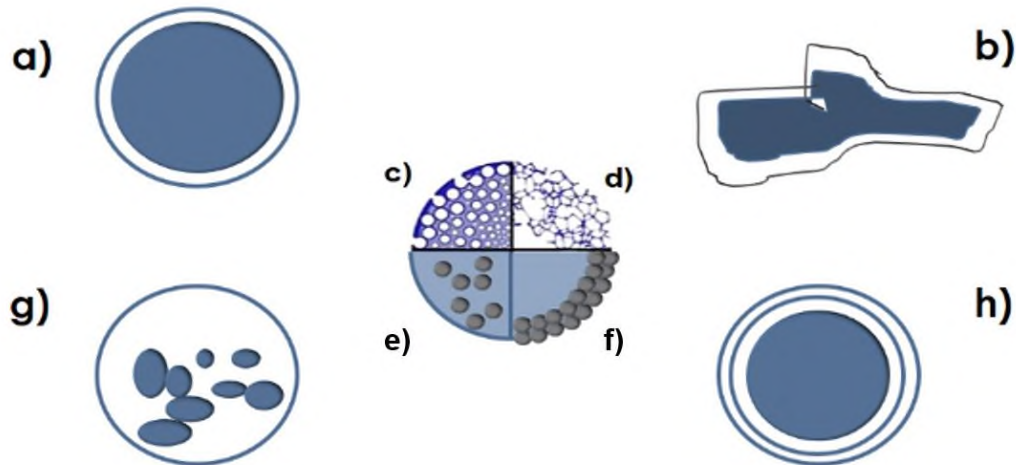


Figura 1.2 Morfología de diferentes tipos de cápsulas. a) Reservorio, c) d) e) y f) estructuras matriciales, g) multi núcleo y h) multi pared. Adaptado de Gibbs *et al.*, (1999).

1.1.3 Técnicas de encapsulación

Para la formación de cápsulas se pueden utilizar diversas técnicas, la Tabla 1.1 muestra características de algunas técnicas de encapsulación usadas en la industria alimentaria. La selección de la técnica de encapsulación depende de las propiedades (físicas y químicas) del material de pared y del compuesto bioactivo a encapsular, así como de la aplicación final de las cápsulas (Desai & Park, 2005).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tabla 1.1 Características de algunas técnicas de encapsulación.

Técnica de encapsulación	Ventajas	Desventajas
Coacervación	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil de llevar acabo - Utiliza uno o más polímeros - La carga es alta 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere un proceso de secado para la producción de polvos - Costoso
Atrapamiento de liposomas	<ul style="list-style-type: none"> - Encapsulación de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Inestabilidad y fuga durante el almacenamiento - Bajos rendimientos de encapsulación - Es costoso - Requiere un proceso de secado
Emulsión	<ul style="list-style-type: none"> - Portador de compuestos hidrófilos e hidrófobos - Fácil de realizar y escalar 	<ul style="list-style-type: none"> - Termodinámicamente inestables - Requiere un proceso de secado para la producción de polvos
Inclusión de complejos	<ul style="list-style-type: none"> - Encapsulación de compuestos hidrofóbicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacidad de carga limitada - Requiere un proceso de secado - Costoso
Secado por aspersión	<ul style="list-style-type: none"> - Producto uniforme cuando se usa el procedimiento adecuado - Operar de forma continua - Para compuestos sensibles al calor - Económico con respecto a otras técnicas de encapsulación 	<ul style="list-style-type: none"> - Costos de instalación - Micro-grietas en la superficie - Eficiencia térmica baja
Aspersión en frío	<ul style="list-style-type: none"> - Segundo revestimiento para liberación controlada - Económico - Fácil de utilizar y escalar - Funcionamiento continuo 	<ul style="list-style-type: none"> - Recubrimiento lipofílico (partículas insolubles en agua) - Expulsión del bioactivo durante el almacenamiento
Liofilización	<ul style="list-style-type: none"> - Ideal para compuestos termosensibles - Alta retención de compuestos volátiles - Hidratación rápida del producto seco 	<ul style="list-style-type: none"> - La muestra debe de ser congelada - Exclusivo para compuestos hidrosolubles - Tiempo de procesamiento prolongado - Estructura porosa

Fuente: Sánchez, 2018.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Dado que los compuestos que se encapsulan se encuentran a menudo en forma líquida, la mayoría de las tecnologías de encapsulación terminan por utilizar un proceso de secado para prolongar la vida útil del producto encapsulado, facilitar su manejo, reducir costos de almacenamiento y facilitar su dosificación. De hecho, la técnica de encapsulación más utilizada en la industria de los alimentos es el secado por aspersión (spray drying), la cual representa del 60 al 80%. En el porcentaje restante se incluyen la técnica de aspersión en frío (spray-chilling), liofilización (freeze-drying), revestimiento en lecho fluido (fluid-bed coating), secado en lecho de aspersión (spray-bed-drying), extrusión en estado fundido (melt extrusion), e inyección en estado fundido (melt injection). La inclusión de moléculas en ciclodextrinas y vesículas liposomales son tecnologías más caras y por lo tanto menos explotadas industrialmente (Nedovic *et al.*, 2011).

1.2 Secado por aspersión

El secado por aspersión, pulverización o “spray drying” es una operación unitaria utilizada para secar soluciones acuosas u orgánicas, emulsiones, suspensiones o dispersiones en la industria alimentaria y química; además, como se ha comentado, también se utiliza para encapsular compuestos de interés dentro de una matriz de protección formada a partir de un polímero, denominado como material de pared y que se incorpora a la mezcla de alimentación que será atomizada (Semyonov *et al.*, 2010).

El proceso de secado por aspersión implica la evaporación de la humedad de un producto líquido atomizado, mediante la mezcla de la aspersión con una corriente de gas caliente, en consecuencia, se obtiene instantáneamente un polvo. El gas generalmente utilizado es aire (ciclo abierto) y rara vez se utiliza un gas inerte como nitrógeno o dióxido de carbono (ciclo cerrado) (Buchi, 2002; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

1.2.1 Etapas del proceso de secado por aspersión

Las etapas en las que se lleva a cabo el secado por aspersión son cuatro las cuales se representan en la Figura 1.3 y se describen a continuación:

- I. Aspersión de la muestra: Un proceso de atomización efectiva convierte la alimentación de un fluido líquido a diminutas gotas de igual tamaño que

conducen a una transferencia de masa y calor uniforme durante el proceso de secado. La selección del tipo de atomizador depende de la naturaleza y cantidad del producto alimentado y de las características deseadas del producto seco (Büchi, 2002).

- II. Contacto gas – muestra: La manera en que la aspersión se pone en contacto con el aire se determina por la posición del atomizador en relación con la entrada de gas de secado (Masters, 1968; Murugesan & Orsat, 2012).
- III. Evaporación de disolvente: Al momento que las gotas del líquido atomizado entran en contacto con el gas de secado, éstas experimentan un proceso de secado.
- IV. Recolección de producto seco: La separación del producto se realiza primero en la base de la cámara de secado (separación primaria); seguida de la recuperación de partículas más finas (separación secundaria), la cual puede llevarse a cabo por ciclones, filtros de bolsa o precipitadores electrostáticos.



Figura 1.3 Etapas del proceso de secado por aspersión (Büchi, 2002; Gharsallaoui et al., 2007).

1.2.2 Nano Spray Dryer B-90

Este nano secador de laboratorio (Figura 1.4) se basa en el concepto fundamentalmente de secado por pulverización, que implica la fabricación de partículas nanométricas a partir de una solución, emulsión o suspensión. Su novedad tecnológica radica en el flujo de gas de secado laminar, la tecnología de aspersion por malla vibratoria para formar gotas finas y la cámara electrostática altamente eficiente para recolectar nanopartículas (Arpagaus *et al.*, 2017).

El Nano Spray Dryer B-90 está diseñado para producir partículas a partir de soluciones o suspensiones con tamaños de partículas de entre 0.3 y 5 μm , con una tasa de recuperación de hasta del 90%. El tamaño de partícula seca depende principalmente de la caperuza de pulverización utilizada (mallas de pulverización con orificios de 4, 5.5, 7 μm). Debido a las vibraciones por frecuencia ultrasónica se expulsan las gotas, el secado se realiza dentro de un cilindro de secado; debido al minúsculo tamaño de las partículas, es necesario disponer de un campo eléctrico para recuperar las partículas a partir del flujo del gas de secado.

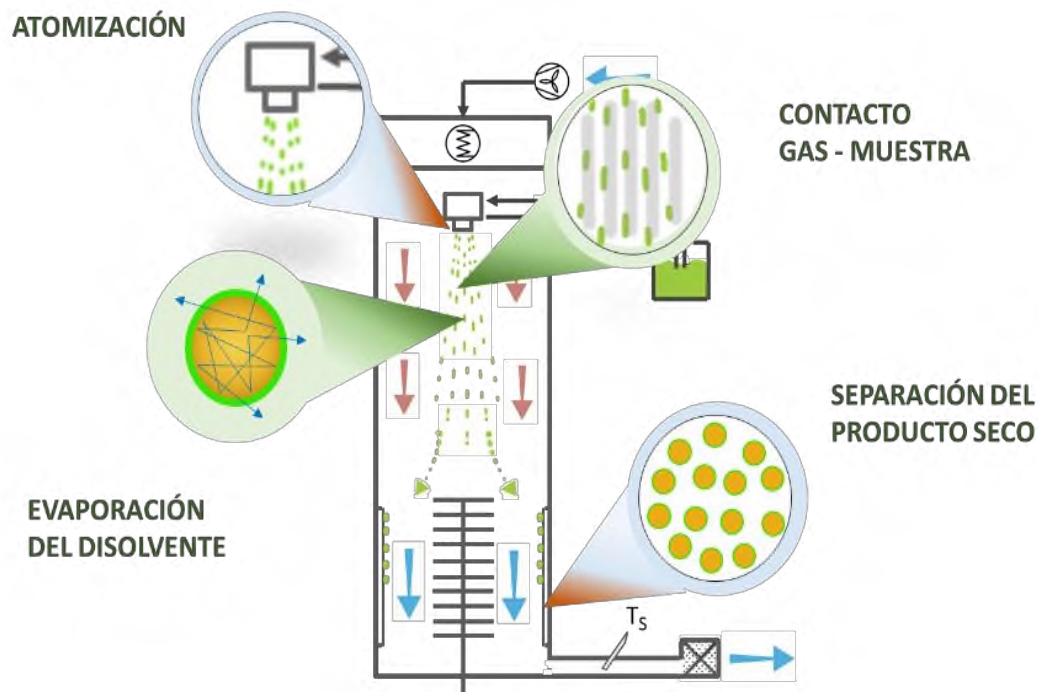


Figura 1.4 Esquema del Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, 2002).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

1.2.3 Aplicación del secado por aspersión como técnica de encapsulación

Existe una gran cantidad de productos que requieren el uso del sistema de secado por aspersión, no sólo para reducir la actividad de agua del producto, sino también para mantener las propiedades físico-químicas de los productos bajo condiciones de estrés favorecidas por el pH, luz, oxígeno, temperatura y humedad relativa.

La encapsulación mediante secado por aspersión es una tecnología en rápida expansión con diversas aplicaciones potenciales en áreas que incluyen productos farmacéuticos y alimentos. Esta técnica ha sido empleada para proteger diversos compuestos bioactivos como vitaminas (Palma-Rodríguez *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2016), enzimas (Betancur-Ancona *et al.*, 2011), antioxidantes y pigmentos (Bule *et al.*, 2010; Bustos-Garza *et al.*, 2013; Castro-Muñoz *et al.*, 2015), microorganismos (Doherty *et al.*, 2012; Gerez, *et al.*, 2012), y también para la liberación controlada en sitios específicos (Estevinho *et al.*, 2013).

1.2.4 Encapsulación de compuestos bioactivos mediante secado por aspersión

Los compuestos bioactivos, son una serie de sustancias presentes en las frutas y plantas que, aunque no tienen una función nutricional definida, o no se consideran esenciales para la salud humana, pueden tener un impacto significativo sobre ella (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008). Una de las limitaciones de estos compuestos es que sólo una pequeña porción de éstos permanece disponible después de la administración oral, debido a su inestabilidad bajo condiciones de procesamiento y almacenamiento y/o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes) (Fang y Bhandari, 2010).

En la industria de alimentos, la encapsulación mediante secado por aspersión ha sido utilizada para proteger diferentes compuestos bioactivos, debido al amplio espectro de beneficios que ofrecen. Algunos de los compuestos que han sido encapsulados incluyen enzimas, aceites esenciales, ácidos grasos, probióticos, vitaminas y compuestos fenólicos (Días *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Estos últimos son los compuestos más comúnmente usados en experimentos que se centran en la optimización de técnicas de encapsulación y en el desarrollo de nuevos materiales de encapsulación (Días *et al.*, 2015).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

1.2.4.1 Ácido ascórbico

La Vitamina C o ácido L-ascórbico (AA), es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante hidrosoluble y posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras. En humanos el AA es un micro-nutriente esencial, necesario para todas las funciones biológicas, juega un papel como cofactor en muchos procesos biológicos incluidas funciones celulares relacionadas con la neuromodulación, hormona, sistema inmune y síntesis de colágeno, que es esencial para los tejidos conectivos y tejido cicatricial en la cicatrización de heridas (Barra *et al.*, 2019).

Debido a su estructura química el AA es muy sensible a la degradación. Numerosos factores influyen en los mecanismos degradativos, entre ellos el pH, la concentración de oxígeno, de enzimas y de catalizadores metálicos. (Serra & Cafaro, 2007)

1.3 Materiales de pared utilizados durante el secado por aspersión

Los materiales de pared son aquellos capaces de formar películas alrededor de los compuestos bioactivos (núcleo), para protegerlo contra el deterioro y permitir su liberación bajo condiciones controladas. Estos materiales deben ser inertes con el material activo a encapsular, solubles en disolventes aceptados por la industria alimentaria, presentar buenas propiedades reológicas a altas concentraciones y brindar máxima protección contra las condiciones ambientales como (luz, calor, oxígeno y humedad) (Shahidi, 2008).

Se emplean diversos criterios para seleccionar un material apropiado para la encapsulación mediante secado por aspersión. Generalmente se tienen en cuenta el tipo de compuesto bioactivo, sus características y la aplicación final del mismo.

Aunque un gran número de sustancias pueden usarse como material de pared o material encapsulante, sólo un número limitado de los mismos han sido certificados para aplicaciones alimentarias como materiales “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés) (Vasisht, 2014). En la Tabla 1.2 se presentan los materiales de pared utilizados generalmente durante el secado por aspersión en el área de alimentos.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tabla 1.2 Materiales de pared utilizados durante el secado por aspersión de productos con fines alimenticios y/o farmacéuticos.

Categoría	Material de pared
Carbohidratos	Almidón, maltodextrinas, quitosano, dextrano, almidón modificado y ciclodextrinas.
Celulosa	Carboximetilcelulosa, metil-celulosa, etil-celulosa, acetato-ftalato de celulosa.
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio y carragenina.
Lípidos	Cera, parafina, aceites, lecitina y grasas.
Proteínas	Gelatina, proteína de soya, proteína de suero de leche.

Fuente: Sánchez, 2018.

Los carbohidratos son los polímeros más utilizados como materiales de pared en el área de alimentos, dentro de este amplio grupo se encuentra el almidón, el cual se ha usado para proteger compuestos bioactivos (Fang & Bhandari, 2010), microorganismos (Li *et al.*, 2016), entre otros. El amplio uso de este polímero se debe a la facilidad con la que sus propiedades pueden ser mejoradas utilizando modificaciones químicas, bioquímicas y físicas para producir materiales de encapsulación de propósito específico (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

1.4 Almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva de la mayoría de los productos agrícolas y probablemente es el segundo carbohidrato más abundante en la naturaleza después de la celulosa. El almidón es una fracción importante de un gran número de productos agrícolas, cuyo contenido en base seca varía de 30 a 80% en los cereales (maíz, trigo, arroz), de 25 a 50% en las leguminosas (frijol, chícharo, haba), de 60 a 90% en los tubérculos (papa, yuca), y hasta 70% en algunas frutas en su estado verde o inmaduro, como en el plátano y el mango (Flores-Gorosquera *et al.*, 2004).

Químicamente, el almidón consiste en dos polímeros de diferente estructura: amilosa y amilopectina (Figura 1.5). La proporción de estos dos polímeros y su organización física

dentro de la estructura granular les confieren propiedades fisicoquímicas y funcionales características a los diferentes almidones (Bello-Pérez et al., 2002).

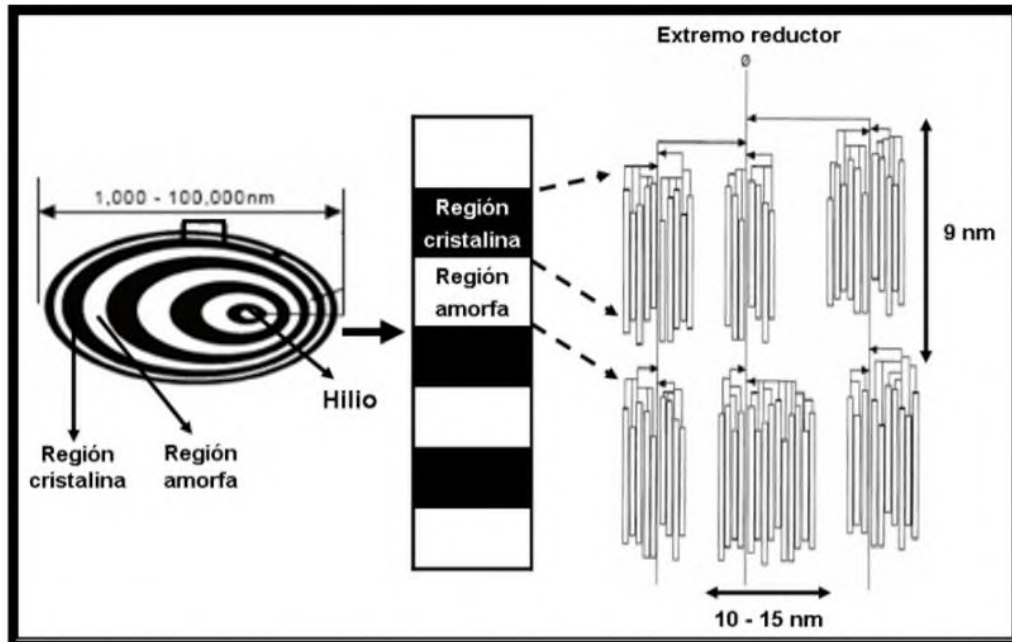


Figura 1.5 Estructura química del almidón (Tomada de Bernal y Martínez, 2006).

1.4.1 Amilosa

La estructura de la amilosa (Figura 1.6) está conformada por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$. También presenta ramificaciones donde las cadenas de glucosa se unen por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, sin embargo, tales ramificaciones son muy escasas y espaciadas, por tal razón, la amilosa es considerada una molécula lineal. Su peso molecular varía entre 150,000 a 1,000,000 Daltones dependiendo del origen biológico y la longitud de la cadena o grado de polimerización (GP), este último fluctúa entre 500 a 6,000 unidades de glucosa que pueden estar distribuidas en 1 a 20 cadenas (Hernández-Medina *et al.*, 2008).

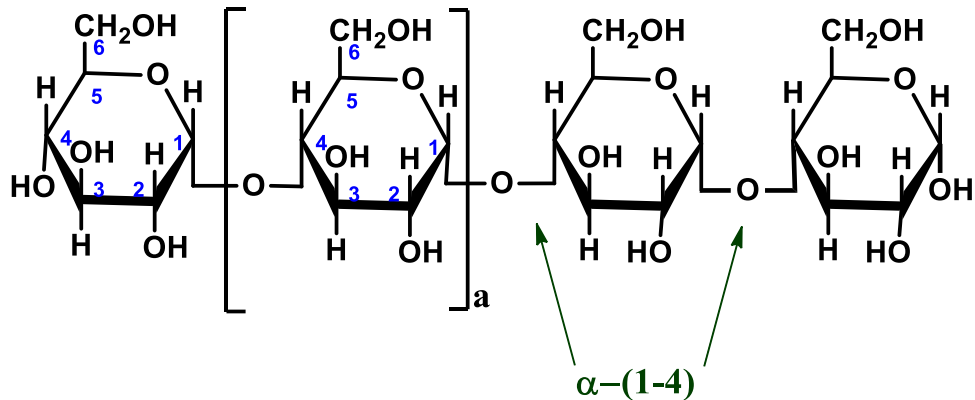


Figura 1.6 Estructura química de la amilosa. Adaptado de Tester y Karkalas (2002).

1.4.2 Amilopectina

La amilopectina es una molécula altamente ramificada (Figura 1.7) formada por glucosa, que además de estar unida por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ que representan un 92-96%, están presentes enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ en los puntos de ramificación, los cuales representan entre un 5 a 6% de los enlaces glucosídicos (Hernández- Medina *et al*, 2008). Dichas ramificaciones, se localizan aproximadamente cada 15-25 unidades de glucosa. En estado nativo presenta un peso molecular elevado, alcanzando los 2×10^6 hasta 2×10^8 Daltones y puede tener una distribución de tamaño molecular muy amplia (Bello- Pérez *et al.*, 2010). La distribución del peso molecular depende del origen botánico del almidón, de las condiciones del aislamiento.

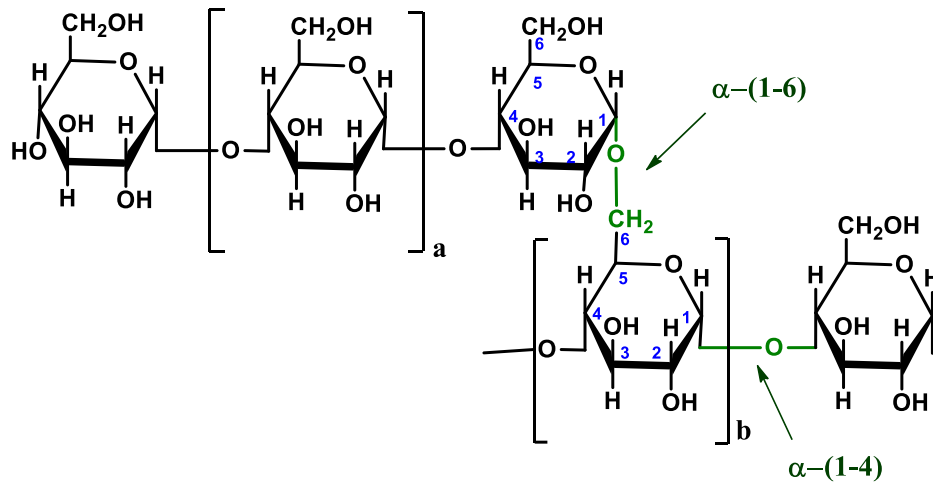


Figura 1.7 Estructura química de la amilopectina. Adaptado de Tester y Karkalas (2002).

1.4.3 Propiedades funcionales del almidón

El almidón es un material de bajo costo y alta disponibilidad debido a que puede ser obtenido a partir de diversas fuentes como legumbres, cereales y frutos en estado inmaduro. El almidón es utilizado en alimentos para modificar la textura, consistencia, la apariencia, como sustituto de grasa, agente encapsulante, aglutinante, espesante; además son fuente de producción de edulcorantes (Aguilar-Sandoval, 2008).

La importancia de estas características radica en el posible uso tecnológico que pueda otorgarse al almidón, así como su comportamiento al ser incorporado en algún producto. Por lo tanto, es preciso conocer y entender los fenómenos de gelatinización y retrogradación.

1.4.3.1 Gelatinización

Debido a que la estructura del almidón es semi-cristalina, los gránulos de almidón no son solubles en agua a temperatura ambiente. Cuando el almidón está en contacto con suficiente agua y se le aplica calor, el gránulo absorbe una cantidad de agua y sufre un hinchamiento hasta cierto límite (Aguilar-Sandoval, 2008). El hinchamiento es reversible al inicio del proceso y las propiedades ópticas del gránulo no se pierden; sin embargo, cuando se alcanza una temperatura determinada se produce un colapso del orden molecular dentro



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

de los gránulos de almidón, provocando cambios irreversibles tales como hinchamiento del gránulo, disociación, pérdida de birrefringencia (Hernández-Medina *et al.*, 2008). Este proceso se conoce como gelatinización y la temperatura a la que ocurre este fenómeno se denomina como temperatura de gelatinización (Ziegler *et al.*, 1993).

1.4.3.2 *Retrogradación*

Tras la gelatinización después de un periodo de almacenamiento prolongado, ocurre la retrogradación. Donde las moléculas de almidón se presentan en forma amorfa, gradualmente se reorganizan formando cristales, que están compuestos por las dobles hélices de almidón. La formación de dobles hélices se debe a interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, los cuales se forman entre las cadenas de almidón (Espinosa-Solís, 2008).

1.4.4 **Fuentes de almidón**

Algunos alimentos se destacan por su contenido de almidón, como los cereales (particularmente maíz, trigo, arroz), algunas raíces y tubérculos.

1.4.4.1 *Fuentes convencionales*

Se le conoce como fuente convencional a los cultivos que son de uso frecuente o que son comúnmente utilizados para la obtención de dicho producto; entre los más utilizados se encuentra el trigo, el maíz, la papa y la yuca. Sin embargo, la desventaja de éstos es que son una fuente importante para la alimentación, por lo que disminuye su disponibilidad. Tal es el caso del maíz que su consumo en México es de suma importancia para la alimentación y se tiene la necesidad de importar 41 millones de dólares (OEC, 2018).

1.4.4.2 *Fuentes no convencionales*

En los últimos años se ha buscado obtener almidón a partir de fuentes que no sean destinadas al consumo humano, y que a su vez se aprovechen los recursos naturales no



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

explotados con los que se cuentan en la región. A estas fuentes se les denominan no convencionales, puesto que su explotación aún no es común. Se buscan fuentes no convencionales como alternativas para obtener almidones que presenten diversas características fisicoquímicas, estructurales y funcionales, que amplíen las aplicaciones en la industria, para ser una alternativa o para sustituir a las fuentes ya utilizadas. Entre las especies que se han estudiado se encuentran la semilla del fruto *Brosimum alicastrum* (Ramón) (Pérez-Pacheco *et al.*, 2014), de pino brasileño *Araucaria angustifolia* (Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017) y de la semilla del fruto de *Talisia esculenta* (pitomba) (Souza de Castro *et al.*, 2018), por mencionar algunos.

1.4.4.3 Semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*) como fuente de almidón

Las semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*) constituyen una fuente potencial no convencional de almidón. El jinicuil es un árbol originario de América tropical que se ha adaptado bien a las condiciones de clima subtropical y se caracteriza por la producción de vainas, en cuyo interior se encuentran semillas de la familia de las leguminosas con cubierta algodonosa, esta semilla contienen proteína, almidón, minerales y vitaminas (Tabla 1.3) (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Esta especie se distribuye desde México hasta el Pacífico en Ecuador y Perú, así como en la zona tropical de Brasil (Martínez *et al.*, 2007). En México, se encuentra en los estados de Chiapas, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Morelos, suroeste y norte de los estados de Tlaxcala e Hidalgo, sureste del estado de México, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Tabasco (Gutiérrez *et al.*, 2015).

El uso principal de esta especie ha sido como árbol de sombra en agroecosistemas, en fincas ganaderas, huertos familiares y como cerco vivo tanto en México como en Centroamérica (Gutiérrez *et al.*, 2015). Las vainas producidas por el árbol se suelen explotar como fuente de alimento, de las cuales, la cubierta blanca, algodonosa, jugosa y dulce que cubre a la semilla (mucilago) se consume en fresco desde la época prehispánica. En algunas regiones, las semillas de jinicuil se cuecen y se consumen con sal y limón, sin embargo, en su mayoría no son aprovechadas ya que son desechadas después de haber consumido el mucilago.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tabla 1.3 Composición química de la semilla de jinicuil (*Inga jinicuil*)

Nutrientes	Semilla (100 g).
Grasas totales	0.90 g.
Carbohidratos	27 g.
Fibras	0.90 g.
Proteínas	11.90 g.
Ca	46 mg.
Hierro	1.90 mg.
Ácido ascórbico	28 mg.
Tiamina	0.08 mg.
Niacina	0.80 mg.
Riboflavina	0.09 mg.

Fuente: Adaptada de Muñoz *et al.*, 1999; Alegría y Rivera, 2011.

En el presente proyecto se propone el uso de las semillas de jinicuil como una fuente no convencional de almidón, esto permitiría establecer una opción para el aprovechamiento de este recurso natural disponible en la región.

1.5 Almidón modificado

Como se ha mencionado, el almidón ha sido utilizado como material de pared durante el secado por aspersión debido a que sus propiedades pueden ser modificadas para obtener características específicas. El almidón modificado tiene prácticamente las mismas aplicaciones que el almidón nativo pero algunas características mejoran y por eso es un aditivo alimentario muy utilizado, sobre todo como espesante, aglutinante, emulgente y estabilizador.

1.5.1 Tipos de modificación aplicados a almidón

Con el fin de mejorar las propiedades funcionales y la utilización de almidones en diversos tipos de aplicaciones, se realizan distintas modificaciones físicas, químicas y/o bioquímicas, esto depende de la fuente del almidón y sus propiedades (Nedovic *et al.*,



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

2011). Hay ocasiones que no es suficiente una sola técnica de modificación para alcanzar las características deseadas, por ello se han introducido métodos de modificación dual, los cuales implican la combinación de dos métodos de modificación, por ejemplo: físicos y químicos, o químicos y enzimáticos (Sánchez-Rivera., 2018).

Los tratamientos, como la extracción, la radiación, la sonicación, molienda mecánica y los tratamientos a presión son métodos de modificación física comúnmente utilizados; en donde el almidón es sometido a una fusión, erosión, cizallamiento y/o gelatinización (parcialmente) en algunos de los casos, dando como resultado una reducción del enlace de hidrógeno (Tharanathan, 2005). Por otro lado, la modificación química implica la introducción de grupos funcionales adecuados en la molécula del polisacárido utilizando reacciones de derivación tales como eterificación, esterificación, entrecruzamiento (reticulación); y las modificaciones por hidrólisis ácida, enzimática u oxidación (Loacutepetz *et al.*, 2010). Los métodos de modificación del almidón descritos posteriormente serán los que se realizarán en el presente trabajo para obtener el almidón con las propiedades adecuadas para utilizarlo como material de pared durante el secado por aspersión.

1.5.1.1 *Entrecruzamiento*

El entrecruzamiento es un método de modificación química durante el cual los almidones nativos se modifican usando diferentes agentes entrecruzantes como trimetafosfato de sodio (STMP), tripolifosfato de sodio (STPP), epiclorohidrina (ECH) y cloruro de fosforilo (POCL_3) (Din *et al.*, 2015). Entre estos reactivos, el STMP es uno de los aditivos alimentarios más usados, debido a que no tiene efectos adversos en los seres humanos y además es un agente eficaz de entrecruzamiento (Woo & Seid, 1997). El entrecruzamiento se lleva a cabo mediante la adición de enlaces covalentes intra e intermoleculares en ubicaciones aleatorias en el gránulo de almidón, fortaleciendo los enlaces de hidrógeno que actúan como puentes entre las moléculas de almidón y nos permite disminuir la viscosidad (Singh *et al.*, 2007).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

1.5.1.2 *Molienda mecánica de alta energía*

La molienda mecánica de alta energía es un proceso que implica la transformación fisicoquímica de la muestra por el suministro de energía generada por el choque entre la muestra, las bolas y el tazón (Wieczorek-Ciurowa *et al.*, 2007). Esta molienda tiene múltiples usos a nivel industrial, entre los usos más recientes se encuentra la producción de harina o las modificaciones de almidón (Li *et al.*, 2014). La molienda mecánica es un método físico que causa daños en la estructura granular, provocando disminución de la cristalinidad y la viscosidad, así como el aumento de solubilidad y del poder de hinchamiento, entre otros (Tan *et al.*, 2015).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe una creciente demanda por parte de los consumidores en ingerir alimentos con mejores características sensoriales y nutricionales que incluso puedan proporcionar beneficios a la salud. Para brindar beneficios a la salud, deben añadirse compuestos bioactivos que confieren acción antioxidante, inhibición o inducción de enzimas, inducción e inhibición de expresión genética, entre otros, además, las evidencias epidemiológicas a través de los años han indicado que el consumo de estos compuestos bioactivos puede jugar un papel importante en la regulación de procesos biológicos normales y patológicos. Esto requiere la aplicación de tecnologías adecuadas que permitan proteger los compuestos bioactivos ante factores externos (ej.: luz, oxígeno, humedad), reduciendo su inestabilidad y prolongando la vida útil de los productos. Una estrategia para conseguir esto es la encapsulación de los compuestos bioactivos.

Aunque se han desarrollado muchas técnicas para encapsular, el secado por aspersión es la tecnología más utilizada en la industria alimentaria debido al bajo costo en comparación con las otras técnicas de encapsulación, y por la disponibilidad de equipos a diferente escala de producción (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008). Existe una búsqueda constante de nuevos materiales encapsulantes que tengan la propiedad de generar una cápsula, los cuales se denominan materiales de pared. Uno de los materiales más utilizados es el almidón (Nedovic *et al.*, 2011). Los criterios para seleccionar los materiales de pared están basados en su costo y en las propiedades fisicoquímicas como formadores de pared, alta solubilidad, baja viscosidad a concentraciones altas, buena emulsificación, temperatura de transición vítrea/fusión, cristalinidad.

Sin embargo, en su forma nativa, los almidones suelen carecer de las propiedades requeridas para lograr una encapsulación eficiente. Algunas alternativas eficaces para mejorar las propiedades encapsulantes de estos materiales consisten en realizar modificaciones físicas y/o químicas. La molienda mecánica de alta energía es un método de modificación física utilizado para mejorar las propiedades funcionales, el cual permite dañar la estructura del gránulo, disminución del tamaño de partículas de almidón (Argun & Kargi 2011). En otros estudios se ha observado que el daño causado por el molino de bolas induce a la pérdida progresiva de la cristalinidad y la conversión de grandes regiones en

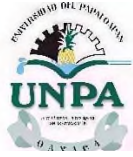


UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

material amorfo que lo vuelven accesible a agentes externos como el agua, enzimas y agentes entrecruzantes (Khalil *et al.*, 2012). El entrecruzamiento es un método de modificación química y se lleva a cabo mediante la adición de enlaces covalentes intra e intermoleculares en ubicaciones aleatorias en el gránulo de almidón, fortaleciendo los enlaces de hidrógeno que actúan como puentes entre las moléculas de almidón (Singh *et al.*, 2007), este método produce una menor viscosidad del almidón nativo. Por lo mencionado anteriormente una modificación dual permitiría obtener la disminución del tamaño de partícula y de la viscosidad del almidón, lo cual permite preparar soluciones con alto contenido de sólidos y una mayor velocidad de secado, debido a la menor evaporación del agua requerida, y una eficiente encapsulación de los compuestos bioactivos.

En Norte América, en general, el maíz es la fuente más comúnmente usada para el aislamiento de almidón; en el caso específico de México, el maíz se utiliza principalmente para la elaboración de las tortillas, por lo que emplear este grano como materia prima para aislar el almidón no resulta práctico, debido a que la producción nacional es insuficiente para abastecer el maíz que se requiere para el consumo humano; de allí la importancia de buscar fuentes alternativas para aislar almidón (Bello-Pérez *et al.*, 2002). Es por ello, que en el presente proyecto se ha buscado obtener almidón a partir de la semilla de jinicuil porque es una fuente que no es destinada directamente al consumo humano y que a su vez permitiría que se aprovechen los recursos naturales no explotados con los que cuenta la región del Papaloapan, y que carece actualmente de valor agregado. Se requiere una caracterización del almidón de la semilla de jinicuil ya que no se cuenta con ningún reporte de las propiedades de este almidón.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

3 HIPÓTESIS

La modificación dual (molienda mecánica + entrecruzamiento) del almidón de la semilla del jinicuil permitirá obtener un material de pared con tamaño de partícula $< 7 \mu\text{m}$ y con viscosidad $< 10 \text{ cP}$, para poder utilizarlo en la encapsulación de compuestos bioactivos mediante secado por aspersión.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener almidón de la semilla del jinicuil (*Inga jinicuil*) modificado dualmente con propiedades de tamaño y viscosidad adecuadas para usarlo como material de pared en la encapsulación de compuestos bioactivos.

4.1.1 Objetivos específicos

1. Modificar dualmente el almidón de la semilla del jinicuil (*Inga jinicuil*) mediante molienda mecánica y entrecruzamiento.
2. Caracterizar fisicoquímica, morfológica y estructuralmente los almidones modificados dualmente.
3. Evaluar la aplicación del almidón dualmente modificado como encapsulante durante el secado por aspersion de compuestos bioactivos aplicando como criterios la eficiencia de encapsulación y el rendimiento del proceso.
4. Caracterizar morfológicamente las cápsulas obtenidas mediante secado por aspersion a través de las técnicas de microscopía electrónica de barrido y distribución de tamaño de partícula.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en 2 etapas. En la primera etapa se realizó el aislamiento, la caracterización del almidón nativo, la modificación dual del almidón y su caracterización térmica, morfológica, estructural y reológica. En la segunda etapa, se realizó la encapsulación de compuestos bioactivos mediante secado por aspersión usando como material de pared el almidón modificado. En la Figura 5.1 se muestra la metodología general del presente proyecto de investigación.

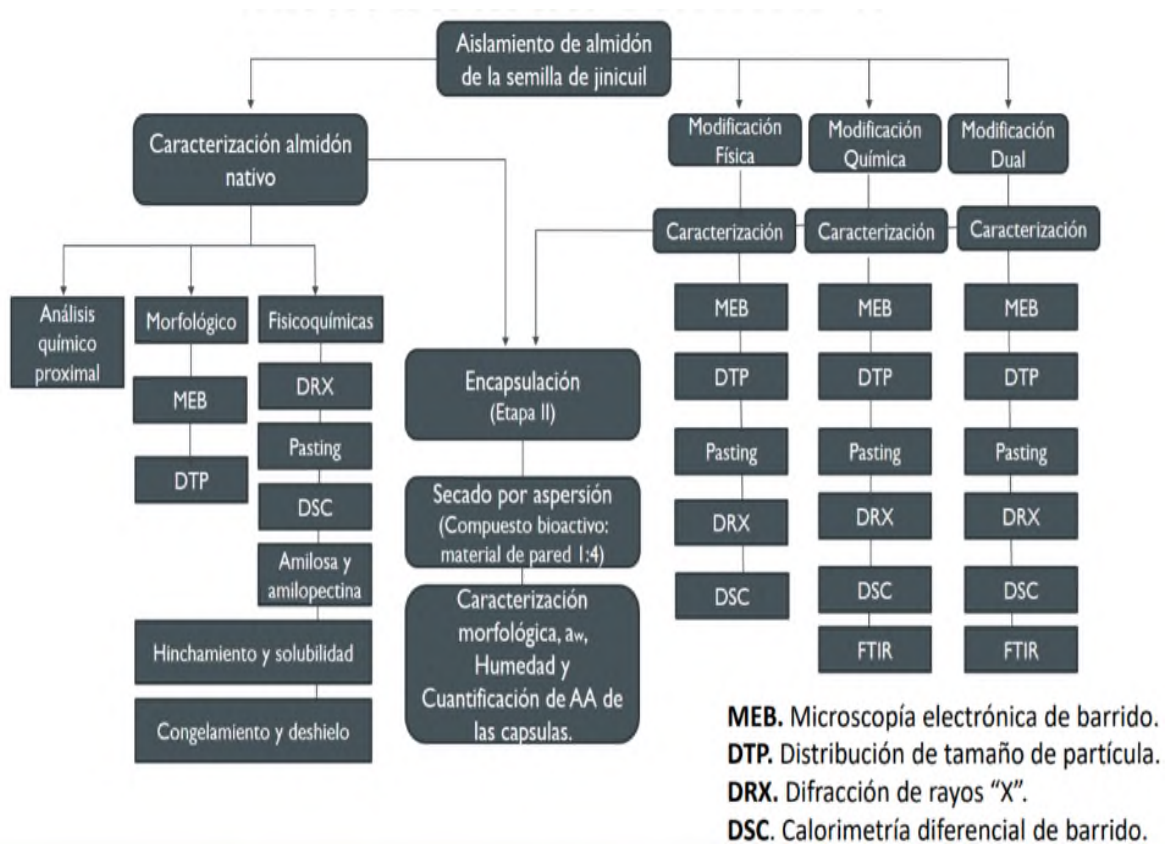


Figura 5.1 Metodología general propuesta en el presente proyecto de investigación.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

5.1 Materia prima y reactivos

Las vainas de jinicuil fueron cosechadas en el municipio de San José Chiltepec, Oax., México, ubicado en las coordenadas: Longitud (dec): -96.170556, Latitud (dec): 17.946667. El kit de ensayo de almidón total (K-TSTA,) se adquirió de Megazyme International (Wicklow, Irlanda). Se utilizó almidón de maíz (*Zea mays*) nativo como modelo, el cual fue adquirido a la industrializadora de maíz IMSA S.A. de C.V. (México). El trimetafosfato de sodio (STMP), tripolifosfato de sodio (STPP), sulfato de sodio e hidróxido de sodio se adquirieron en Sigma-Aldrich S.L. (Toluca, México). El compuesto estándar a encapsular (ácido ascórbico) se adquirió en Sigma-Aldrich S.L. (Toluca, México). Todos los productos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

5.2 Aislamiento del almidón

El aislamiento del almidón de las semillas del jinicuil se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Flores-Gorosquera *et al.*, (2004) con ligeras modificaciones. Se procesaron 25 kg de semilla; se pelaron y se molieron por lotes de 250 g en una licuadora tipo industrial (Waring, mod CB15, Stamford, CT, USA). Se adicionaron 1.5 L de agua y posteriormente la mezcla de molienda se pasó sucesivamente a través de las mallas No. 40 (0.420 mm), 100 (0.149 mm), 200 (0.074 mm) y 325 (0.044 mm) con ayuda de una tamizadora eléctrica (Retsch, Modelo AS 200, Haan, Alemania). Se descartó el material retenido en las mallas y el material líquido se dejó sedimentar a 20 °C durante 12 h, posteriormente el sobrenadante se eliminó por decantación. El precipitado se lavó tres veces por suspensión en agua y se centrifugó (Heraus Megafuge, 16 R, ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA) a 4000 xg por 10 min. El pigmento se retiró con una espátula y el sedimento se deshidrató en un secador de charolas (SUSESA, México) ajustado a una temperatura de 40 °C, durante 24 h. El producto seco recolectado se trituró en un mortero y se tamizó a través de la malla No. 100. El producto tamizado se almacenó en un recipiente sellado hasta su posterior uso.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

5.3 Caracterización del almidón nativo

Para la caracterización del almidón nativo se realizó análisis químico proximal, análisis fisicoquímicos, análisis morfológico y análisis estructural; cada uno de éstos se describen a continuación.

5.3.1 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal se realizó mediante la metodología propuesta por la AACCI (2000). Las pruebas se realizaron por triplicado.

5.3.1.1 Humedad

El contenido de humedad se determinó por pérdida de peso en estufa al vacío de acuerdo con el método 44-16.01 (AACCI, 2000). Se pesaron 1 g de muestra en charolas de aluminio (puestas previamente a peso constante), se colocaron en la estufa al vacío a 0.2030 psi (Shel Lab, Mod. 1425; Cornelius, OR, USA) a 65 °C hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 5 h). Posteriormente se atemperaron en un desecador por 20 min. Finalmente se pesaron en balanza analítica (Ohaus, Mod. AR2140, Parsippany, NJ, USA) y se determinó el porcentaje de humedad en base seca (H bs) por diferencia de peso de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$H\ bs\ (\%) = \frac{Muestra\ húmeda\ (g) - Muestra\ seca\ (g)}{Muestra\ seca\ (g)} \times 100 \quad (1)$$

5.3.1.2 Proteínas

La determinación del contenido de proteínas se realizó de acuerdo con el método 46-13.01 (AACCI, 2000), donde se cuantifica el contenido de nitrógeno libre mediante el método Kjeldahl. Se pesó 0.25 g de muestra y se le adicionaron 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro y 5 mL de ácido sulfúrico. El matraz se colocó en el digestor Micro Kjeldahl de bloques (Prendo, Mod. DIK-40; Puebla, México) y se calentó gradualmente hasta alcanzar 400 °C, la temperatura se mantuvo durante 1.5 h, tiempo suficiente para que todo el material se carbonizara y se lograra observar que el contenido



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

del matraz obtuvo un color verde claro. Posteriormente, se dejaron enfriar las muestras hasta alcanzar temperatura ambiente (25 °C), aproximadamente 30 min. Posteriormente se colocó el matraz Kjeldahl en el destilador Micro kjeldahl (Preaso, Mod. DEK-1; Puebla, México) y se adicionaron 21 mL de agua destilada para disolver completamente el residuo del matraz y 15 mL de solución de hidróxido de sodio al 60% (p/v). El destilado se recibió en un matraz Erlenmeyer que contenía 12 mL de ácido bórico al 4%, y 2 gotas de indicador de Wesslow. Se destiló hasta recolectar 50 mL aproximadamente y se retiró el matraz para finalmente titular con ácido clorhídrico 0.1 N hasta obtener un viraje a color violeta. El contenido de proteínas se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Proteínas(\%)} = \frac{(\text{mL de HCl gastados})(N \text{ del HCl})(0.014)}{\text{Sólidos secos de la muestra (g)}} \times F \times 100 \quad (2)$$

Donde:

N = Normalidad

F = Factor de proteína de 6.25 para la conversión al contenido proteico.

5.3.1.3 Lípidos

El contenido de lípidos se determinó de acuerdo con el método 30-25.01 (AACCI, 2000) utilizando el equipo de extracción Soxhlet. En un cartucho de papel filtro se colocó 1 g de la muestra y se sometió a la extracción con 100 mL de éter de petróleo contenidos en un matraz bola llevado a peso constante previamente. La extracción se realizó por un periodo de 5 h a una potencia de calentamiento suficiente para conseguir 6 recirculaciones por h. Transcurrido el tiempo de extracción, los matraces se dejaron secar en estufa a 65 °C hasta alcanzar peso constante (en una hora aproximadamente). Finalmente, el porcentaje de lípidos se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{\text{Peso final del matraz (g)} - \text{Peso inicial del matraz (g)}}{\text{Sólidos secos de la muestra (g)}} \times 100 \quad (3)$$

5.3.1.4 Cenizas

El contenido de cenizas se determinó de acuerdo con el método 08-01.01 (AACC, 2000). Las muestras se colocaron en crisoles previamente llevados a masa constante, y se



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

calcinaron en su totalidad en una parrilla (Prendo, Mod. PCA-1500, Puebla, México). Posteriormente, las muestras calcinadas se introdujeron en una mufla (Wise Therm, mod. FH-14, Wertheim, Alemania) a 550 °C durante 5 h. Las muestras fueron retiradas 24 h después y se colocaron en un desecador para atemperarlas y finalmente pesarlas en una balanza analítica (Ohaus, Mod. AR2140, Parsippany, NJ, USA). El porcentaje de cenizas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{\text{Peso final del crisol (g)} - \text{peso inicial del crisol (g)}}{\text{Sólidos secos de la muestra (g)}} \times 100 \quad (4)$$

5.3.2 Características morfológicas

5.3.2.1 Microscopía de luz transmitida y luz polarizada

El almidón se roció sobre un portaobjetos, asegurando una capa especialmente delgada, se añadió una gota de agua destilada para ayudar a dispersar la muestra y finalmente se colocó un cubreobjeto. Los gránulos de almidón se observaron a través de un microscopio de luz polarizada (Leica DM750, Heerbrugg, Suiza), equipado con cámara digital a color con sensor CMOS (1/2") y objetivos 10X, 40X y 100X (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza). La captura de las imágenes se hizo con el software LAS V4.12 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza).

5.3.2.2 Microscopía electrónica de barrido

Para el estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB), las muestras de almidón se fijaron a una cinta conductora de cobre con doble cara, que se cubrió con una capa de carbón a un espesor de 20 nm. La capa se depositó al vacío con un evaporador JEOL (JEOL JSM-7401, Tokio, Japón). Posteriormente, la cinta se cubrió con una capa de oro de 50 nm de espesor en un ionizador de metal (JEOL JSM5200, Tokio, Japón). La morfología de los gránulos de almidón se observó utilizando un microscopio electrónico de barrido (Japan Electronic Optical Limited, JSEM 35CX; Tokio, Japón). La forma y las características superficiales de las partículas de las muestras se observaron y se analizaron a un voltaje de operación de 15 kV y amplificados a 500, 750 y 1500x.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

5.3.2.3 Distribución del tamaño de partícula

Se utilizó un analizador de tamaño de partícula por dispersión de luz estática (Malvern Instruments, Mastersizer 3000; Malvern, Reino Unido) ubicado en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) del Tecnológico Nacional de México/IT Veracruz. Se utilizó el sistema dispersor húmedo (Malvern Instrument, Hydro EV; Malvern, Reino Unido). Se utilizaron 500 mL de agua destilada a 25 °C como disolvente. Se adicionó 0.250 g de muestra y se aplicó ultrasonido al 90% de la capacidad del equipo 100% (40 W máximo). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado. El tamaño de partícula se expresó como la distribución de volumen (Malvern Instruments Ltd., 1990).

5.3.3 Propiedades Fisicoquímicas

Se evaluaron el perfil de viscosidad (pasting), temperatura de gelatinización y difracción de rayos-X para estimar el nivel de cristalinidad de los gránulos del almidón. Además, se evaluó las propiedades funcionales del almidón nativo de las semillas de jinicuil. Las pruebas se realizaron por triplicado.

5.3.3.1 Perfil de viscosidad

Para determinar el perfil de viscosidad se preparó una dispersión de almidón al 10% (p/v) con agua destilada y se transfirió a la celda de aluminio (capacidad: 30 mL) del reómetro (TA Instruments, Discovery HR-2 Hybrid; New Castle, DE, USA) equipado con una cámara y geometría específica para caracterización de almidones (SPC SMART SWAF, Mod. 110533, New Castle, DE, USA) con un diámetro de 32.40 mm y GAP 500 μm (distancia entre la geometría y la base). Se programó un ciclo de calentamiento-cocción-enfriamiento. La temperatura inicial fue de 30 °C la cual se mantuvo por 60 s, posteriormente se realizó un calentamiento a una velocidad de 15 °C/min hasta 90 °C, manteniendo esta temperatura durante 360 s y finalmente se enfrió a una velocidad de 30 °C/min hasta alcanzar 30 °C, manteniéndose a esa temperatura por 420 s. La prueba se realizó a una velocidad de corte de 16.8 s^{-1} . Se utilizó el software TA Instrument Trios versión 4 (New



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Castle, DE, USA) para obtener los valores de viscosidad con respecto al tiempo y la temperatura.

5.3.3.2 Gelatinización

La temperatura y entalpía de gelatinización del almidón se evaluó usando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) (TA Discovery, DSC250; New Castle, DE, USA) utilizando el método propuesto por Paredes-López *et al.*, (1994). Se pesaron 2 mg de muestra dentro de una charola de aluminio hermética (No. de charola 901684.901), posteriormente se le adicionaron 7 μ L de agua desionizada. La charola se selló herméticamente y se dejó equilibrar por 1 h a temperatura ambiente antes de realizar el análisis. Como referencia se utilizó una charola vacía de aluminio. La muestra se sometió a un programa de calentamiento en un intervalo de temperatura de 30-180 °C y velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura de inicio (Ti), temperatura de gelatinización (Tp) y la temperatura final (Tf) se obtuvieron directamente del análisis de los datos con el software TA Instruments Trios versión 4 (New Castle, DE, USA).

5.3.3.3 Difracción de rayos-X (DRX)

Los patrones de difracción se obtuvieron con un difractómetro de rayos-X (Bruker Axs, mod. D8 Advance; 76187 Karlsruhe, Alemania). Las muestras se colocaron sobre el portamuestras del difractómetro de rayos X de ángulo ancho, se analizaron en 2θ de 5 a 60° equipado con una fuente de corriente de 40 kV y 30 mA, generando una radiación de Cu K α con filtro de Ni y rejilla de 2 mm. Los datos se analizaron mediante el software Origin Lab versión 7 (Northampton, MA, USA). Para cuantificar la cristalinidad del polímero se utilizó la siguiente ecuación (Zortéa-Guidolin, *et al.*, 2017).

$$\text{Cristalinidad (\%)} = \frac{\text{Área cristalina}}{\text{Área total}} \times 100 \quad (5)$$



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

5.3.3.4 *Contenido de amilosa y amilopectina*

El contenido de amilosa se obtuvo de acuerdo con el método propuesto por Hoover y Ratnayake, (2002). Se pesaron 20 mg de almidón, se disolvieron en 80 mL de dimetilsulfóxido al 90% (m/v). Se agitó vigorosamente por 20 min y luego se calentó en un baño de agua con agitación durante 15 min a 85 °C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se aforó a un volumen de 25 mL con agua. Se midió 1 mL de la solución anterior, el cual se mezcló con 5 mL de solución I₂/KI (I₂ a 0.025 M y KI a 0.0065 M en la mezcla final) y luego se ajustó con agua a un volumen final de 50 mL. Las muestras se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente y se leyeron a una absorbancia de 600 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Mod. GENESYS 10S; Waltham, MA, USA). Para la preparación del testigo se siguió el mismo procedimiento, pero sin incluir el almidón. Se elaboró una recta de calibración mezclando diferentes relaciones de 0.1 a 1.0 mg/mL de amilosa, y a partir de la ecuación de regresión lineal se calculó la concentración de amilosa de la muestra en estudio. Los resultados se expresaron como a mg/mL almidón.

5.3.3.5 *Contenido de almidón total*

El contenido de almidón total se determinó por el método enzimático de Megazyme (Total Starch (100A) KIT, Lot 170104-6, Co. Wicklow, A98 YV29. Irlanda). Se pesaron 100 mg del almidón en tubos de ensayo y se humectaron con 0.2 mL de etanol al 80% en agua. Posteriormente se mezclaron con 2 mL de KOH 2M y se mantuvieron en agitación durante 20 min. Se adicionaron 8 mL de regulador de acetato de sodio (pH 3.8) y se mezclaron con 0.1 mL de α-amilasa y 0.1 mL de amilogucosidasa, posteriormente se incubaron en un baño maría a 50 °C, durante 30 min. El líquido resultante se aforó con agua destilada a 100 mL, de este volumen se tomó una alícuota de 10 mL y se centrifugó a 1800 xg durante 10 minutos. Del sobrenadante 0.1 mL fueron transferidos a un tubo de ensayo y se añadieron 3 mL de GOPOD (glucosa oxidasa/peroxidasa), la mezcla se dejó incubar a 50 °C por 20 minutos y finalizado el tiempo se leyó absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Mod. GENESYS 10S, Waltham, MA, USA).

$$\mu\text{g glucosa/mL} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia patrón}} \quad (6)$$



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

$$\text{Almidón total (\%)} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g glucosa}}{\text{mL}}\right)V \times 0.9 \times 100}{\mu\text{g de muestra}} \quad (7)$$

Donde V es el volumen de la muestra, y 0.9 es el factor de conversión de glucosa a almidón.

5.3.3.6 Hinchamiento y solubilidad

El poder de hinchamiento y solubilidad se determinaron a 60, 70, 80 y 90 °C de acuerdo con lo descrito por Pérez-Pacheco *et al.*, (2014). En tubos de centrifuga previamente tarados se prepararon 40 mL de una suspensión de almidón al 1% (p/v) y se sometieron a temperatura constante (60, 70, 80 o 90 °C, según el set experimental) en un baño de calentamiento durante 30 min, se les proporcionó agitación constante a las suspensiones para mantenerlas uniformes. Las muestras se dejaron enfriar en un ángulo de 45° a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras se centrifugaron (Heraeus Megafuge, 16 R; Waltham, MA, USA) a 4000 xg durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se pesaron los gránulos hinchados. Del sobrenadante se recolectaron 10 mL y se colocaron en charolas de aluminio previamente taradas. Los sobrenadantes se secaron en una estufa (Shel Lab, Mod. 1425; Cornelius, OR, USA) a 120 °C hasta pesos constante (4 h aproximadamente). Posteriormente, las charolas con las muestras secas se atemperaron en desecador y se pesaron en balanza analítica (Ohaus, Mod. AR2140, Parsippany, NJ, USA). La solubilidad y el poder de hinchamiento se estimaron con las ecuaciones (8) y (9), respectivamente.

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Peso del almidón soluble (g)}}{\text{Peso de la muestra (g b.s.)}} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{Poder de hinchamiento} = \frac{\text{Peso del sedimento (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)} - \text{Peso del almidón soluble (g)}} \quad (9)$$

5.3.3.7 Estabilidad en congelamiento-deshielo y refrigeración

La estabilidad en congelamiento-deshielo y refrigeración del almidón se realizó de acuerdo con el método propuesto por Eliasson *et al.*, (1992). Se pesó 0.25 g de muestra, se le adicionaron 5 mL de agua destilada. La mezcla se agitó y se calentó a 85 °C durante 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 min. Se registraron los pesos de



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

las muestras contenidas en cada tubo de centrifuga y posteriormente se almacenaron a temperaturas de refrigeración (4.4 °C) y de congelación (-12 °C). Después de 24 h, todos los tubos se retiraron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 h. Los tubos con las muestras se centrifugaron (Heraus Megafuge 16 R, Waltham, MA, USA) a 8,000 $\times g$ durante 10 min. Después de la centrifugación, los tubos se invirtieron para separar el líquido libre del gel de almidón y se registró el peso del gel restante. La extensión de la sinéresis se calculó como la relación entre el peso del líquido decantado y el peso total del gel antes de la centrifugación. Los tubos se regresaron al congelador para realizar más ciclos de congelación-deshielo y refrigeración. Se realizaron cinco ciclos de 24 h cada uno para el estudio.

$$\text{Sinéresis (\%)} = \frac{\text{Peso del líquido decantado}}{\text{Peso de la muestra antes de la centrifugación}} \times 100 \quad (10)$$

5.4 Modificación dual del almidón

El proceso de la modificación dual se llevó a cabo en dos etapas, en la etapa A se realizó una modificación física por molienda mecánica (MM); posteriormente en la etapa B, la modificación química mediante entrecruzamiento (EC). Las cuales también se realizaron por separado para poder evaluar el efecto de cada una de las modificaciones. Las etapas del proceso se describen a continuación.

5.4.1 Molienda mecánica

Se utilizó un equipo de molienda mecánica de alta energía (Planetary Micro Mill Pulverisette; Idar-Oberstein, Alemania) para reducir el tamaño de partícula del almidón, según el método propuesto por Lin *et al.*, (2016), el cual se realizó con ligeras modificaciones. Se adicionó la muestra en el tazón de molienda de 80 mL en una relación bolas de nitruro de silicio: almidón de 1:4 (m/m). Las muestras se homogenizaron con ayuda de una espátula. Se colocaron los tazones en el molino programado bajo las condiciones de molienda de estudio. Se evaluaron 28 y 38 $\times g$ rpm en ciclos de 5 min cada uno. Entre cada ciclo, las muestras se dejaron atemperar durante 10 min. Los ciclos se repitieron hasta alcanzar 50, 60, 70 y 80 min de molienda. Al término de la molienda las muestras se recuperaron y se almacenaron en un frasco para su posterior análisis.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

5.4.2 Entrecruzamiento

El almidón entrecruzado se preparó usando el método de Seib y Woo (1999). Se pesaron 50 g del almidón modificado por molienda, se adicionaron 70 mL de agua, 2.98 g de STMP, 0.3 g de STPP y 2.5 g de sulfato de sodio. Se ajustó el pH de esta mezcla a 11.5 adicionando hidróxido de sodio 1 M. Esta suspensión se agitó constantemente y se calentó a una temperatura de 45 °C por 3 h. Después la suspensión se neutralizó a pH 6.5 adicionando HCl 1 M. El almidón se obtuvo por centrifugación (Heraus Megafuge 16 R, Waltham, MA, USA) y se lavó con agua (3 lavados). La suspensión se secó en una estufa a 14.6198 PSI (Shel Lab, Mod. 1425; Cornelius, OR, USA) a 40 °C por 24 h, para obtener el almidón modificado.

5.5 Caracterización de los almidones modificados

Para la caracterización de los diferentes almidones modificados se realizaron análisis morfológico y propiedades fisicoquímicas.

5.5.1 Características morfológicas

Los análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB), y de distribución de tamaño de partícula (DTP), se realizaron de acuerdo con lo descrito en los apartados 6.3.2.2 y 6.3.2.3, respectivamente.

5.5.2 Propiedades fisicoquímicas

Los análisis de perfil de viscosidad, temperatura de gelatinización y difracción de rayos X, se realizaron de acuerdo a lo descrito en los apartados 6.3.3.1, 6.3.3.2 y 6.3.3.3 respectivamente. Adicionalmente se realizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier para corroborar la adición de los grupos fosfatos durante el entrecruzamiento de los almidones modificados.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

5.5.2.1 *Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)*

Los análisis se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, DYNASCAN Spectrum 100; Shelton, 06484, USA) utilizando un interferómetro de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros se obtuvieron con una resolución de 4 cm^{-1} , en un intervalo de $4000\text{-}515\text{ cm}^{-1}$.

5.6 Encapsulación mediante secado por aspersión

El estudio de viabilidad del uso del almidón modificado de la semilla de jinicuil como material de pared (agente encapsulante) se realizó mediante secado por aspersión para la formación de cápsulas.

5.6.1 Preparación de la mezcla de alimentación

Se disolvieron los materiales de pared (almidones modificados) en agua a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agitaron durante 20 min para asegurar su homogenización. Posteriormente se adicionó la cantidad suficiente de ácido ascórbico para conseguir una proporción de material de pared:compuesto bioactivo de 4:1 (p/p). La mezcla se agitó nuevamente durante 5 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. El contenido de sólidos en la mezcla fue 20% (p/p) en la mezcla. La preparación de las mezclas de alimentación y los experimentos de secado se realizaron el mismo día.

5.6.2 Secado por aspersión

Para realizar la microencapsulación se utilizó un secador por aspersión a escala laboratorio (BÜCHI, Micro Spray Dryer B-290; Flawil, Herisau, Suiza) (Figura 5.2) ubicado en la Universidad de Cádiz (España). Se usó una boquilla de diámetro estándar de 0.7 mm y un tapón de rosca de boquilla de 1.5 mm de diámetro y se empleó aire como gas de secado. En todos los casos, el flujo de gas de atomización se mantuvo fijo a 40 mm en el indicador rotámetro de gas, lo cual corresponde a $667\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ según las especificaciones del fabricante. La presión de atomización fue de $6\times 10^5\text{ Pa}$. La tasa de aspiración se mantuvo al 100% de la capacidad operativa ($35\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ de acuerdo con las especificaciones del fabricante). La temperatura del aire de entrada (T_{ent}) y la temperatura del aire de salida

(Tsal) al secador se mantuvo a 140 y 70 °C, respectivamente, según los resultados obtenidos por Dang *et al.*, (2016). Las mezclas se alimentaron con una bomba peristáltica con caudal variable para controlar la respectiva Tsal.



Figura 5-2 Secador por aspersion a escala laboratorio BÜCHI, Micro Spray Dryer B-290.

Los experimentos de secado por aspersion se realizaron por triplicado. Las cápsulas obtenidas se almacenaron en bolsas laminadas selladas térmicamente y se mantuvieron a 25 °C hasta su análisis. El rendimiento del proceso se calculó como la relación entre los sólidos recuperados y los sólidos alimentados al secador.

5.7 Caracterización de las cápsulas obtenidas

Para conocer la estabilidad de las cápsulas y la eficiencia de encapsulación, se realizó la caracterización de éstas por análisis fisicoquímicos y análisis morfológico.

5.7.1 Análisis fisicoquímicos

El contenido de humedad de las muestras se determinó de acuerdo con lo descrito en la sección 5.3.1.1. Adicionalmente se determinaron la actividad de agua (a_w) y el contenido de ácido ascórbico. Las mediciones se realizaron por triplicado.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

5.7.1.1 Actividad de agua

La actividad de agua en las cápsulas se determinó a 25 °C utilizando un medidor de actividad de agua (Decagon Devices, Inc., AquaLab VSA; Pullman, WA, USA).

5.7.1.2 Contenido de ácido ascórbico

La estimación del contenido de ácido ascórbico en la superficie de las cápsulas (*AA superficial*) se realizó de acuerdo con lo descrito por Leyva-López *et al.*, (2019). Se colocaron 250 mg de la muestra y se le adicionaron 25 mL de agua destilada, se agitó durante 15 s. Se transfirió 100 µL de la muestra a un matraz de 10 mL, se aforó con el diluyente (4 mL de ácido sulfúrico, 120 mL de acetona, 876 mL de agua Mili-Q), para asegurar la integridad de la muestra, y se filtró. Se analizó en un cromatógrafo iónico (Metrohm, 919 Autosampler Plus; Herisau, Suiza) acoplado a un detector de conductividad (Metrohm, IC Conductivity Detector; Herisau, Suiza). La concentración de ácido ascórbico en las muestras se determinó utilizando la curva de calibración para el ácido ascórbico ($y = 2.06 \cdot 10^{-4}x - 0.02$; $r^2 = 0.9997$) se realizó en el rango de 1 a 100 ppm (Vázquez-Espinosa *et al.*, 2019). Este mismo procedimiento se llevó a cabo para determinar el contenido de ácido ascórbico total en las cápsulas (*AA total*); la única diferencia fue que la mezcla se llevó a sonicación (Bandelin, SONOPULS HD 3200; Berlín, Alemania) durante 10 min a 15 °C, potencia 200 W, frecuencia 45 kHz; para asegurar la ruptura total de la cápsula. La eficiencia de encapsulación se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de encapsulación}(\%) = \frac{AA \text{ total} - AA \text{ superficial}}{AA \text{ total}} \times 100 \quad (11)$$

5.7.2 Análisis morfológicos

La microscopía electrónica de barrido (MEB), y la distribución del tamaño de las cápsulas, se llevaron a cabo de acuerdo con lo descrito en las secciones 5.3.2.2 y 5.3.2.3, respectivamente.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento del almidón de las semillas de jinicuil

A partir de 23.7 kg de vainas de jinicuil, se recuperaron 5.7 kg de semillas (sin mucílago) con una humedad de $3.5 \pm 0.7\%$ en base húmeda (bh). El rendimiento de almidón aislado fue de 7.63% con base en la masa húmeda de las semillas de jinicuil, y de 7.9% con base en los sólidos secos de las semillas. Estos valores son superiores a lo reportado para frutos de la variedad de plátano Gros Michel (5.78% bh) cultivada en Colombia (Chávez-Salazar *et al.*, 2017). Pérez-Pacheco *et al.*, (2014) y Zortéa-Guidolin *et al.*, (2017) reportaron el aislamiento de almidón a partir de semillas de los frutos de *Brosimum alicastrum* (Ramón) y de las semillas de pino brasileño (*Araucaria angustifolia*), sin embargo, no estimaron el rendimiento del proceso de aislamiento.

6.2 Caracterización del almidón nativo de las semillas de jinicuil

Los resultados obtenidos durante la caracterización del almidón de la semilla de jinicuil (*Inga jinicuil*) se evaluaron y se compararon con otros almidones de fuentes convencionales y no convencionales ya reportados, ya que no existe información sobre la caracterización estructural, morfológica térmica y/o reológica del almidón de jinicuil.

6.2.1 Análisis químico proximal

En la Tabla 7.1 se presentan los valores obtenidos para el análisis químico proximal del almidón nativo de las semillas de jinicuil.

Como puede observarse en la Tabla 6.1, el contenido de humedad del almidón de la semilla de jinicuil fue mayor a lo reportado para almidón de maíz blanco y azul (6.9 y 6.5%) respectivamente y menor al de maíz híbrido (8.5%) cultivados en Chihuahua (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019). El almidón bajo estudio presentó un contenido de humedad menor al 10%, lo que garantiza la estabilidad del producto por lo que podría clasificarse como microbiológicamente seguro y podría almacenarse a largo plazo (Tontul y Topuz, 2017).

Tabla 6.1 Composición química proximal del almidón nativo de la semilla de jinicuil (*Inga jinicuil*).

Componentes	Almidón de jinicuil g/100 g s.s.	Almidón de maíz g/100 g s.s.
Humedad	7.82 ± 0.24 ^b	8.94 ± 0.08 ^a
Proteínas	20.93 ± 1.54 ^a	10.14 ± 0.25 ^b
Lípidos	2.08 ± 0.05 ^a	0.25 ± 0.05 ^b
Cenizas	0.27 ± 0.04 ^b	0.97 ± 0.03 ^a

*Los valores corresponden al valor de tres repeticiones ± error estándar. Los valores en filas que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El contenido de cenizas del almidón de las semillas de jinicuil fue similar a los reportado para almidón de plátano de la variedad FHIA 20 (0.29% ss) cultivada en Colombia (Chávez-Salazar *et al.*, 2017) y mayor a lo reportado por Bustillos-Rodríguez *et al.*, (2019) para maíz blanco, azul e híbrido (0.1%). Bustillos-Rodríguez *et al.*, (2019) atribuyen que la presencia de minerales en el almidón está relacionada con el aumento de la claridad y la viscosidad de la pasta.

En el caso de lípidos y proteínas, los contenidos de estos componentes en el almidón bajo estudio (Tabla 6.1) es mayor a lo reportado por otros autores para almidón de semilla *Brosimum alicastrum* Swarts, almidón de plátano y almidón de semilla de pitomba (Pérez-Pacheco *et al.*, 2014; Chávez-Salazar *et al.*, 2017; Souza de Castro *et al.*, 2019), respectivamente. Aparicio-Saguilán *et al.*, (2006) reportan que valores mayores al 1% en lípidos puede afectar la temperatura de gelatinización del almidón o las propiedades de pegado, debido a la formación de complejos de amilosa-lípidos. Hoyos-Leyva *et al.*, (2018) sugieren que la presencia de una fracción proteica importante puede llevar a la floculación de la mezcla de alimentación de secadores por aspersion, lo que dificulta en consecuencia el funcionamiento de la boquilla del secador y la estructura de las cápsulas generadas. Las proteínas cargadas positivamente formarían coacervados complejos con cadenas de almidón cargadas negativamente, que son inestables en condiciones acuosas y precipitan bajo efectos de agregación (Hoyos-Leyva *et al.*, 2018). Sin embargo, otros autores sugieren que durante el secado por aspersion el contenido de proteína en almidones representa un agente de unión para generar agregados esféricos que actúan finalmente como cápsulas (Gonzalez-Soto *et al.*, 2011).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6.2.2 Caracterización morfológica

6.2.2.1 Microscopía electrónica de barrido, microscopía de luz polarizada y microscopía óptica

La morfología de los gránulos de almidón nativo de jinicuil se muestra en la Figura 7.1. El gránulo presentó formas esféricas ovaladas, esto coincide con lo reportado para almidones de semillas de Ramón (Pérez-Pacheco *et al.*, 2014) y de pino, aunque este último gránulo también presenta algunas formas elipsoidales truncadas (Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017), de igual forma a lo reportado por Bustillos-Rodríguez *et al.*, (2019) para almidón de maíz quienes atribuyen que las diferencias estructurales podrían estar relacionadas con la biosíntesis de almidón, por la bioquímica del organelo que sintetiza el almidón en el amiloplasto, partiendo de hilio, el cual es el punto de inicio de la biosíntesis del almidón. La amilopectina llega a formar racimos, los cuales se alinean perpendicularmente a los anillos de crecimiento y crecen a partir del hilio a la superficie (Espinosa-Solis., 2008).

Los gránulos de almidón de jinicuil presentaron superficies suaves y no fracturadas Figura 6-2 (a). Souza de Castro *et al.*, (2019) sugieren que estas características indican que se siguió un método que no dañara la estructura del gránulo del almidón. Las micrografías sugieren que el gránulo bajo estudio posee un tamaño promedio $< 10 \mu\text{m}$, esto fue menor a lo reportado por Bustillos-Rodríguez *et al.*, (2019) con tamaños mayores a $13.3 \mu\text{m}$, $19 \mu\text{m}$ y $21.4 \mu\text{m}$ para almidones de maíz azul, maíz blanco y maíz híbrido, respectivamente.

En las micrografías presentadas en la Figura 6.1 se observan algunos aglomerados, lo cual podría estar asociado al alto contenido de proteína del almidón de jinicuil (Tabla 6.1). Resultados similares fueron reportados por Maniglia *et al.*, (2016). Esto se ve favorecido por los puentes de hidrogeno y las fuerzas de Van der Waals (Bravo-Nuñez., 2001).

En las imágenes de luz polarizada que se presentan en la Figura 6-2 (b) se observó que los gránulos del almidón presentaron la cruz de malta, esto es conocido como birrefringencia, la cual sólo implica que existe un alto grado de orientación molecular dentro del gránulo de almidón y no hace referencia a ninguna forma cristalina. Estos resultados muestran que el proceso de aislamiento del almidón no afectó la estructura granular (Chávez- Salazar *et al.*, 2017).

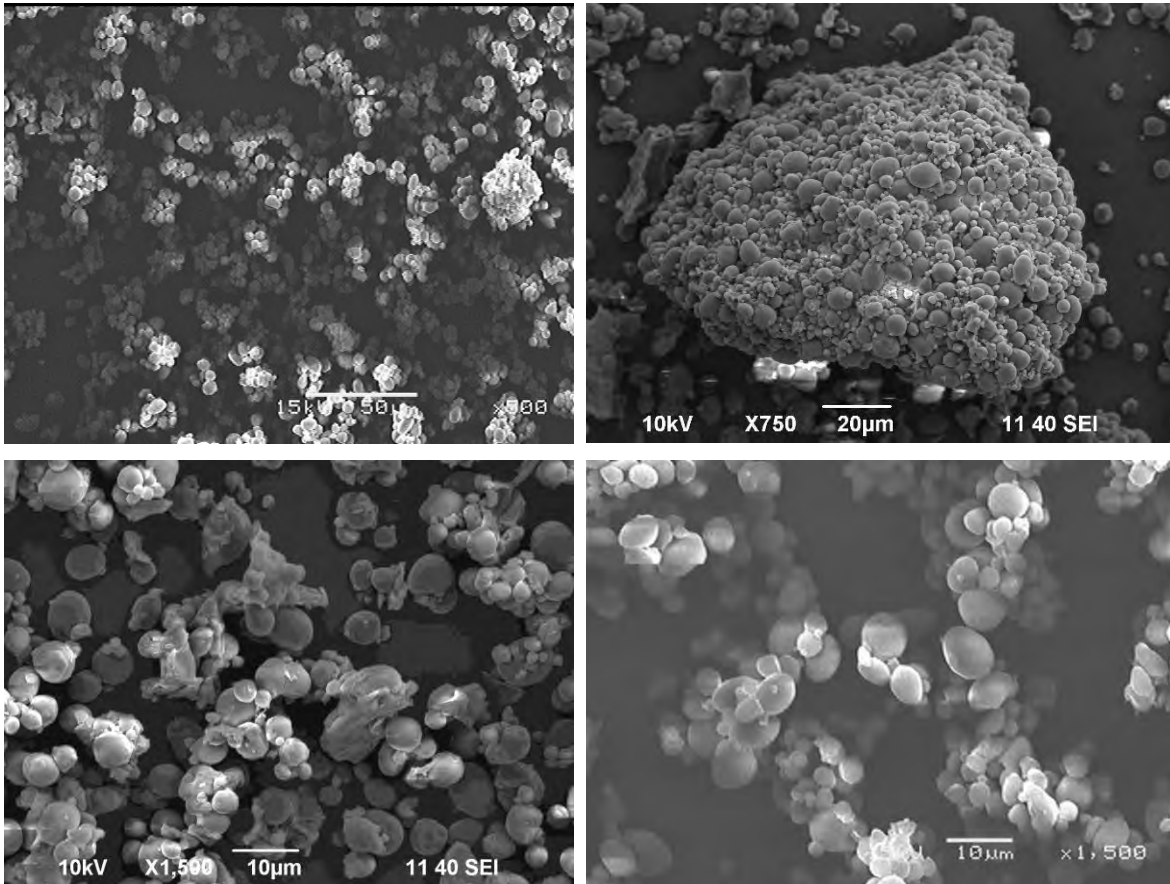


Figura 6.1 Imágenes de microscopía electrónica de barrido del almidón nativo de la semilla de jinicuil (*Inga jinicuil*).

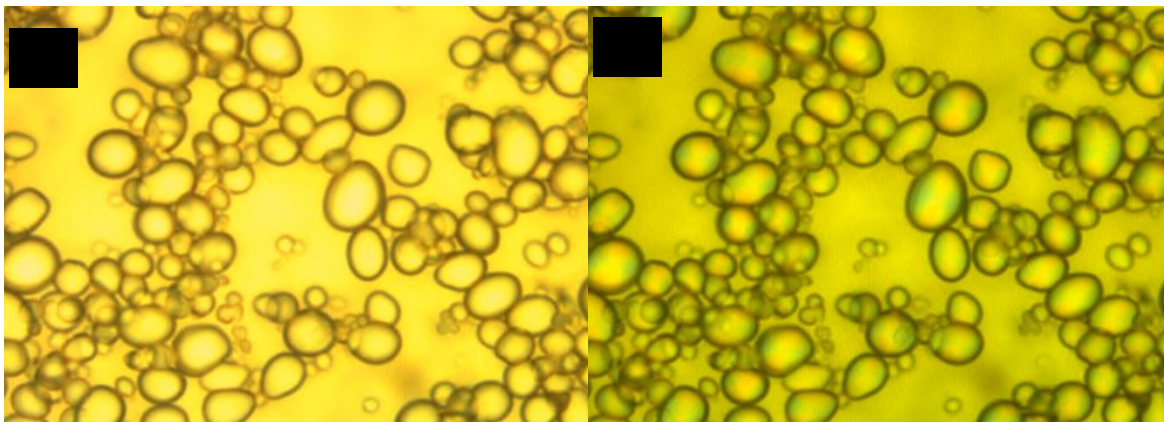


Figura 6.2 Imágenes de microscopía óptica de almidón nativo de la semilla de jinicuil (*Inga jinicuil*): **A)** campo claro y **B)** luz polarizada.

6.2.2.2 Distribución de tamaño de partícula

En la Figura 6.3 se muestra la distribución del tamaño del gránulo de almidón de jinicuil. El almidón bajo estudio presentó una distribución de tamaño multimodal, con un pico principal correspondiente a un tamaño promedio de 6.5 μm , y un pico menor a 1 μm . Sin embargo, también se observa un tercer pico de menor volumen a más de 10 μm , lo cual concuerda con la formación de aglomerados (Figura 6.1) favorecida por el alto contenido de proteína (Tabla 7.1) (Maniglia *et al.*, 2016). El tamaño del gránulo de almidón representa un papel importante en la determinación de sus propiedades físicas, tales como gelatinización, cristalinidad, solubilidad y viscosidad (Wijaya *et al.*, 2019). También el tamaño de partícula de los gránulos determina qué aplicaciones se le puede dar, por ejemplo, en algunas películas de plástico biodegradables si las dimensiones del almidón son pequeñas y de recubrimiento si el tamaño del gránulo es mayor (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019).

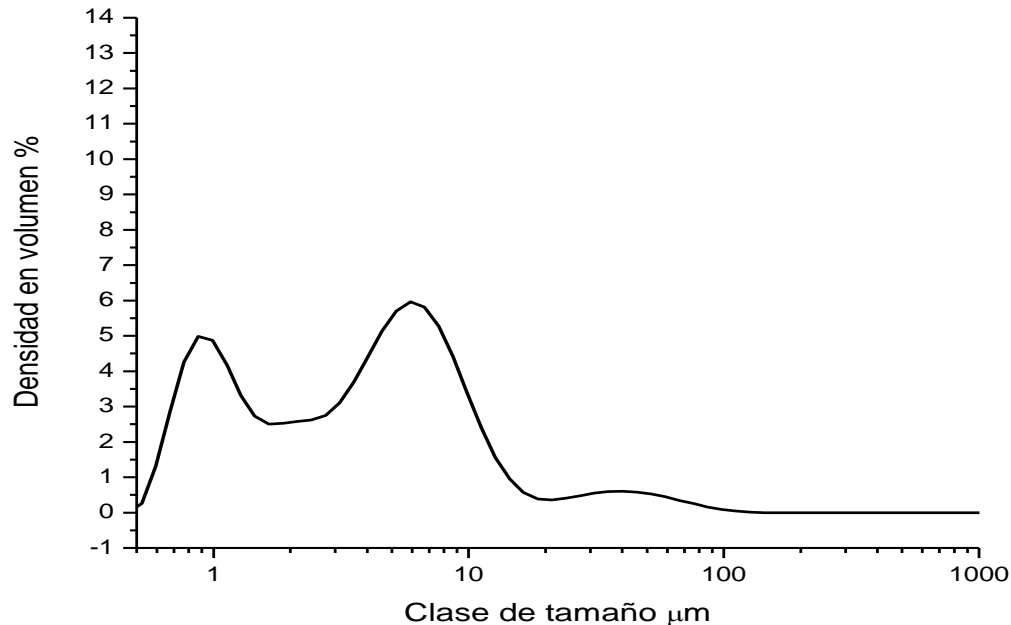


Figura 6.3 Distribución del tamaño del gránulo del almidón nativo de semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Algunos autores clasifican los gránulos de almidón dependiendo del tamaño: grandes $> 25 \mu\text{m}$, medianos $10\text{-}24 \mu\text{m}$, pequeños $5\text{-}9 \mu\text{m}$, muy pequeños $< 5 \mu\text{m}$ (Lindeboom *et al.*, 2004). De acuerdo con esta clasificación, el gránulo de almidón de jinicuil es pequeño, esto sugiere que presentaría una alta dispersión en agua, y se podría utilizar como material de pared en la microencapsulación de algunos compuestos mediante secado por aspersión.

6.2.3 Propiedades Fisicoquímicas

6.2.3.1 Perfil de Pasting

Cuando se realiza una dispersión de almidón en agua y se somete a calentamiento, los gránulos de almidón empiezan a hincharse, lo cual produce un incremento de la viscosidad. Obteniendo un pico de viscosidad máxima, debido al hinchamiento máximo del gránulo antes de su rompimiento físico. En la etapa de enfriamiento se obtiene otro pico de viscosidad (viscosidad final) debido a la reorganización de las cadenas principalmente de la amilosa (Rangel-Cortez *et al.*, 2017). La transición de orden–desorden que sufren los gránulos de almidón, tiene gran impacto en el procesamiento, calidad y estabilidad de los productos basados en almidón (Pineda-Gómez *et al.*, 2010).

El perfil de viscosidad del almidón de la semilla de jinicuil se observa en la Figura 6.4, en el cual, durante la etapa de calentamiento la viscosidad aumentó gradualmente, presentando una temperatura de inicio de pasting de $86.89 \text{ }^\circ\text{C}$ con una viscosidad de 258.1 cP , hasta alcanzar a $91.87 \text{ }^\circ\text{C}$ un pico máximo de viscosidad de 1830 cP . Estos valores se relacionan con lo observado por DSC (Tabla 7.2). El valor máximo de viscosidad es menor a lo reportado para almidones de semillas de pino brasileño (2231 a 2678 cP) (Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017), de semillas del fruto pitomba (2631 cP) (Souza de Castro *et al.*, 2018) y de la planta *Limnophila aromatica* (4380 cP) (Wijaya *et al.*, 2019). Esto sugiere que el almidón de la semilla de jinicuil posee bajo contenido de amilopectina en comparación con los almidones citados, esto concuerda con lo observado en la difracción de rayos-X (Figura 6.5). Wijaya *et al.*, (2019) reportan que, a mayor contenido de amilopectina, se alcanza un mayor pico de viscosidad. La menor viscosidad del almidón de jinicuil, con respecto a los almidones citados, representaría una ventaja durante la encapsulación mediante secado por aspersión, debido a que se permitiría la producción de partículas con tamaño promedio menores, debido a que cuanto mayor es la viscosidad de la mezcla de alimentación, más

grandes son las gotitas formadas durante la atomización y, por lo tanto, mayor es el tamaño de las partículas secas (Tontul y Topuz, 2017). Sin embargo, para alcanzar tamaños de partículas nanométricos aún se requieren modificaciones del gránulo de almidón de jinicuil para disminuir la viscosidad por debajo de 10 cP (Büchi, 2002).

Las temperaturas de pasting de los almidones de semillas de pino brasileño estuvieron en el intervalo de 59.4 a 62.1 °C (Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017), para las semillas de pitomba fue de 77.5 °C (Souza de Castro *et al.*, 2018) y para la planta *Limnophila aromatica* fue de 79.3 °C (Wijaya *et al.*, 2019). Estos valores son menores a lo obtenido para el almidón bajo estudio (91.87 °C), lo que sugiere que este almidón puede ser utilizado en procesos térmicos que no superen los 90 °C y que al mismo tiempo no se requiera la gelatinización del polímero, por ejemplo, en procesos donde se requiera la pasteurización (Souza de Castro *et al.*, 2018).

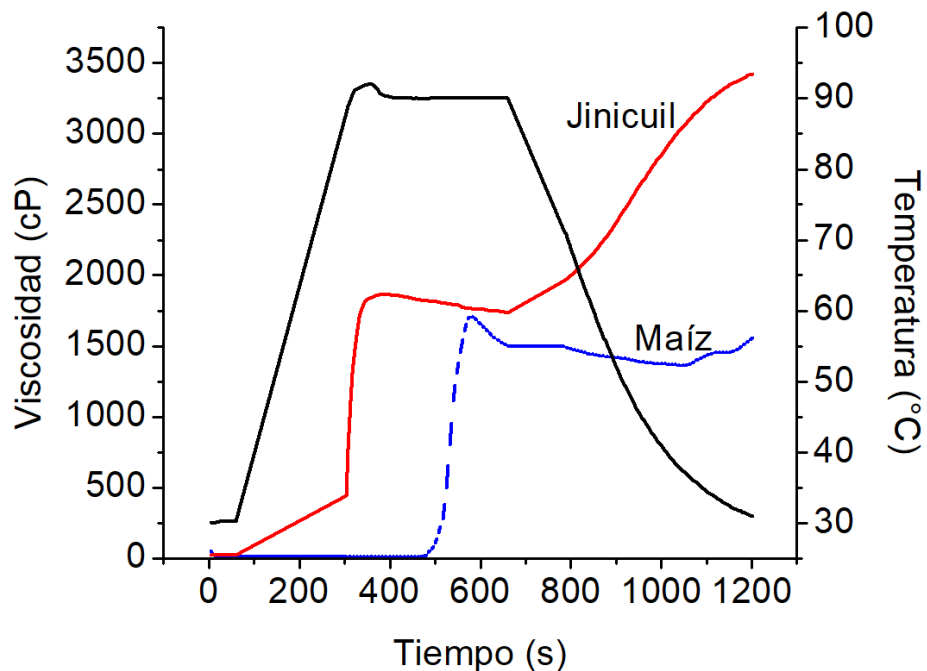


Figura 6.4 Perfil de viscosidad del almidón nativo de la semilla de jinicuil (*Inga jinicuil*).

La viscosidad final del gránulo del almidón de jinicuil fue de 3425.4 cP, cuyo valor es mayor a lo reportado para almidones de semillas de pino brasileño (2287-2955 cP) (Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017) y para almidones de las semillas de pitomba (1607 cP) (Souza de



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Castro *et al.*, 2018). Este resultado sugiere que el gránulo de almidón presenta mayor contenido de amilosa que amilopectina. El incremento observado en el valor de viscosidad durante la etapa de enfriamiento (Figura 6.4) es debido a la reorganización de las cadenas de la amilosa que forma una interacción con el agua por medio de puentes de hidrógeno, formando finalmente una red tridimensional (Moo-Huchin *et al.*, 2015).

6.2.3.2 *Temperatura de gelatinización*

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se ha aplicado para medir el calor de gelatinización de los almidones y de sus componentes (amilosa y amilopectina). Los resultados dan información del fenómeno orden-desorden de las moléculas (Bello-Pérez., 2003).

Las propiedades térmicas del almidón nativo de la semilla de jinicuil se presentan en la Tabla 6.2. El almidón presentó una temperatura pico (temperatura de gelatinización) alta a comparación de lo reportado por otros autores para almidón de nativo de plátano (79 °C) y almidón de plátano lintnerizado (75.8 °C) (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2006), almidón de arroz (73.53 °C), papa (61.73 °C) (Palma-Rodríguez 2012), almidón de plátano Gros Michel (73.55) (Chávez-Salazar *et al.*, 2017) y de almidón de maíz (73.94 °C) (Sánchez-Rivera 2018). La temperatura de gelatinización varía de acuerdo con la fuente del almidón y su tamaño de partícula (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2006). Palma-Rodríguez (2012) reporta que la gelatinización está relacionada con la estructura molecular de la amilopectina, con la perfección y ordenamiento de los cristales, la longitud de las cadenas, el grado de ramificación, el peso molecular, la composición amilosa- amilopectina y la estructura interna del gránulo (relación región amorfa y cristalina). Esto nos sugiere que la temperatura de gelatinización del almidón de jinicuil se asocia a un alto grado de ordenamiento, pues esto proporciona estabilidad a la estructura del gránulo y hace que éste sea más resistente a la gelatinización.

La entalpía es una medida general de la cristalinidad del gránulo de almidón y es un indicador de la pérdida del orden molecular en el gránulo (Palma-Rodríguez 2012). La entalpía del gránulo de almidón de la semilla de jinicuil se presenta en la Tabla 6.2. Los valores obtenidos fueron mayores a los reportados para otros almidones nativos, como



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

almidón de arroz (10.46 J/g), maíz (11.20 J/g) (Palma-Rodríguez 2012) y plátanos Gros Michel (9.47 J/g) y Dominico (8.04 J/g) (Chávez-Salazar *et al.*, 2017). La entalpía de gelatinización indica la cantidad de energía requerida para que se lleve a cabo la disociación de las dobles hélice en la gelatinización. Estos valores de entalpía concuerdan con lo observado con la temperatura de gelatinización, por factores como la forma, el tamaño del gránulo y el grado de cristalinidad del almidón (Bustillos- Rodríguez *et al.*, 2019);

La caracterización térmica del almidón es importante porque este polisacárido se somete a varios procesos de transformación térmica en la industria y algunas empresas justifican los costos de sus procesos con respecto a la energía y el tiempo (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019).

Tabla 6.2 Temperaturas de gelatinización de almidón nativo de la semilla de jinicuil.

Almidón	Temperatura de inicio (°C)	Temperatura de gelatinización (°C)	Temperatura final (°C)	Entalpía (J/g)
Jinicuil	84.53 ± 0.05 ^a	87.85 ± 0.05 ^a	98.02 ± 0.14 ^a	15.27 ± 0.33 ^a
Maíz	70.40 ± 0.18 ^b	74.62 ± 0.58 ^b	79.69 ± 0.18 ^b	12.19 ± 0.47 ^b

*Los valores corresponden a la media de tres repeticiones ± error estándar. Los valores en columnas que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

6.2.3.3 Difracción de rayos-X (DRX)

En la Figura 6.5 se puede observar el patrón de difracción de rayos-X del almidón nativo de las semillas de jinicuil. En orden para identificar la cristalinidad del almidón bajo estudio, su patrón de difracción se comparó contra los patrones de difracción de otros almidones (Moo-Huchin *et al.*, 2015; Maniglia *et al.*, 2016; Chávez-Salazar *et al.*, 2017; Wijaya *et al.*, 2019). El almidón nativo de jinicuil mostró picos de difracción de mayor intensidad en los ángulos 2θ a 15°, 17°, 18° y 23°, lo cual corresponde a un patrón de difracción tipo A, el cual generalmente lo presentan los cereales (Hizukuri, 1986; Moo-Huchin *et al.*, 2015; Wijaya *et al.*, 2019). Las variaciones en los patrones de difracción pueden variar debido a las condiciones de crecimiento del cultivo y el método de aislamiento

utilizado, debido a que éste puede afectar la estructura granular del almidón (Chávez-Salazar *et al.*, 2017).

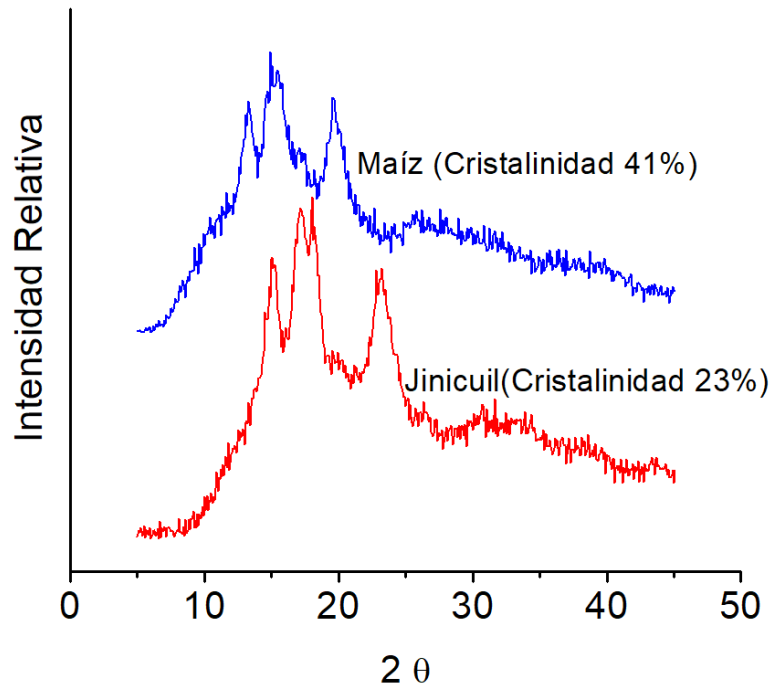


Figura 6.5 Patrón de difracción de rayos-X del almidón nativo de las semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*).

El índice de cristalinidad está principalmente relacionado a la estructura del gránulo de almidón. La región cristalina del gránulo consiste en cadenas laterales de amilopectina, mientras que la región amorfa comprende de amilosa y ramificaciones de amilopectina. Por lo tanto, la cristalinidad del gránulo de almidón está asociada con las dobles hélices de la amilopectina (Maniglia *et al.*, 2016). La relación entre el área cristalina y el área total en el patrón de difracción determina el índice de cristalinidad del almidón (Wijaya *et al.*, 2019). El almidón de jinicuil tiene menor cristalinidad ($23.18 \pm 2.82\%$) que los almidones de las semillas de pino brasileño ($26.37\text{-}30.46\%$) (Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017) y que los almidones de las semillas de Ramón ($30.56 \pm 0.98\%$) (Moo-Huchin *et al.*, 2015), los cuales presentaron un patrón de difracción tipo C. Esto podría indicar que el almidón de la semilla de jinicuil posee bajo contenido de amilopectina con respecto a los almidones citados. Además, de acuerdo con Maniglia *et al.*, (2016), el alto contenido de proteína en el gránulo de almidón podría también contribuir a la baja cristalinidad del almidón bajo estudio.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6.2.3.4 *Contenido de amilosa y amilopectina*

Las propiedades físicas de los almidones están relacionadas con la proporción amilosa-amilopectina (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019). El contenido de amilosa presente en el almidón de estudio se presenta en la Tabla 6.3, el cual fue similar a lo reportado para almidón de maíz híbrido (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019), que se puede clasificar y usar como referencia del almidón de maíz normal (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2006). El almidón de jinicuil tiene menor contenido de amilosa que los almidones de frijol pinto (32.0%), frijol negro (45.4%), maíz azul (22.4%) y maíz blanco (21.9%), (Shuang- Kui *et al.*, 2014; Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019). Entre los diferentes almidones, el contenido de amilosa está generalmente controlado por factores genéticos y algunos factores externos como las condiciones de crecimiento: clima, suelo, temporada de cosecha (Shuang- Kui *et al.*, 2014). Li *et al.*, (2007) reporta que los gránulos pequeños contienen menor amilosa que los gránulos grandes y esto concuerda con lo observado con MEB (Figura 6.1) y DTP (Figura 6.3), que indican que el tamaño del granulo de almidón de la semilla de jinicuil es pequeño.

La amilopectina es el componente principal de los almidones normales y es responsable de la estructura semicristalina de los gránulos, desempeña un papel clave en el poder de hinchamiento y las propiedades de viscosidad de los almidones (Mottin *et al.*, 2016). Un alto contenido de amilopectina podría formar geles con una baja tendencia a retrogradación (Pérez-Pacheco *et al.*, 2014).

6.2.3.5 *Contenido de almidón total*

El contenido de almidón total presente en el almidón bajo estudio se presenta en la Tabla 6.3. El proceso de aislamiento no permitió obtener un almidón puro (> 95% de almidón total) (Bello-Pérez, 2003), esto coincide con lo reportado en el análisis químico proximal (Tabla 7.1), donde se observó que existe una fracción importante de proteína y lípidos, la cual podría influir en las propiedades funcionales del almidón como se observa en el poder de hinchamiento del gránulo (Figura 6.6). Adicionalmente, la variedad y el grado de madurez del fruto puede influir sobre el rendimiento de almidón total (Chávez-Salazar *et al.*, 2017). El contenido de almidón total fue mayor a lo reportado para cuatro variedades de maíz (Zhengdan958, Jiangyu877, Suyu30 y Suyu29) cultivadas en China (Kai Shi *et al.*,



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

2018), pero menor a lo reportado por Chávez-Salazar *et al.*, (2017) para plátanos de las variedades Dominico Harton y FHIA20 (84 y 83.5% respectivamente).

Tabla 6.3 Contenido de amilosa, amilopectina y almidón total.

Muestra	Amilosa (%)	Amilopectina (%)	Almidón total (g/100g)
Almidón de Jinicuil	21.00 ± 2.23 ^b	79.00 ± 0.58 ^a	76.71 ± 1.54 ^b
Almidón de maíz	26.65 ± 0.55 ^a	72.75 ± 0.72 ^b	83.97 ± 2.81 ^a

*Los valores corresponden a la media de tres repeticiones ± error estándar. Los valores en columnas que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

6.2.3.6 Hinchamiento y solubilidad

El poder de hinchamiento del almidón de la semilla de jinicuil, se presenta en la Figura 7.6 donde se puede apreciar que los gránulos del almidón se resisten al hinchamiento a temperaturas menores de 80 °C. Hernández-Medina *et al.*, (2008) reporta que la resistencia al hinchamiento está relacionada con la temperatura de gelatinización, aunque entre los 70 y 90 °C, los gránulos de todos los almidones se hinchan gradualmente a medida que se aumenta la temperatura. Como se reportó, por DSC se estimó que la temperatura de gelatinización fue de 87.85 ± 0.05 °C para el almidón de la semilla de jinicuil (Tabla 6.2), lo cual concuerda con la resistencia al hinchamiento observada hasta 80 °C. A partir de este valor se observó un incremento en el poder de hinchamiento (Figura 6.6). Esto es debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno intermoleculares de las zonas amorfas, que permiten una absorción irreversible y progresiva del agua (Lil *et al.*, 1995). El mayor poder de hinchamiento se obtuvo a los 90 °C, esto está correlacionado con los resultados del perfil de Pasting (Figura 7.4), en donde se observa que la viscosidad máxima se alcanza a los 90 °C antes del colapso del gránulo de almidón, este pico de viscosidad es atribuida a la amilopectina. El poder de hinchamiento es inhibido por el contenido de proteína y lípidos presente en el almidón (Hernández-Medina *et al.*, 2008). A temperaturas menores de 80 °C no hay un incremento en el poder de hinchamiento, ya que la proteína presente (ver contenido en Tabla 6.1) está recubriendo el gránulo de almidón, tal y como se observó por MEB (Figura 6.1), impidiendo que el gránulo tenga interacción con el agua y éste empiece

a hincharse. También se ha reportado que los lípidos presentes en los almidones podrían generar complejos con la amilosa, lo cual impediría que el gránulo se hinche (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2006).

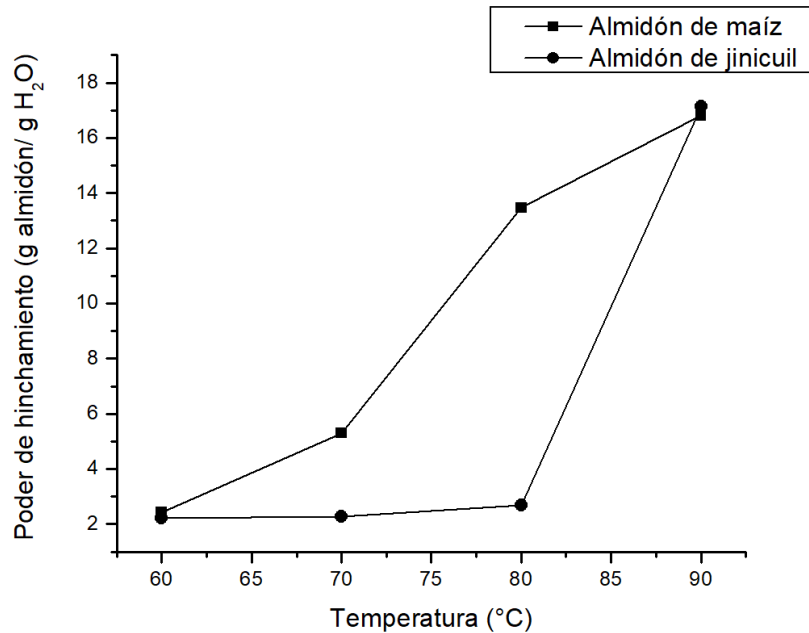


Figura 6.6 Poder de hinchamiento del gránulo de almidón de jinicuil

En cuanto a los patrones de solubilidad que se muestran en la Figura 6.7, se puede observar que la solubilidad no incrementó a temperaturas menores de 80 °C, y se observa que a los 90 °C presenta el mayor porcentaje de solubilidad, este comportamiento se debe a que los gránulos hinchados del almidón permiten la lixiviación de amilosa, lo cual durante la gelatinización del almidón es la principal responsable de que se incremente el porcentaje de solubilidad (Méndez-Montealvo *et al.*, 2006).

Vamadevan y Bertoft (2015) reportaron que la integridad granular del almidón es un factor importante que determina el hinchamiento y la solubilidad. Con respecto a lo observado en MEB (Figura 6.1), no se presentan poros o grietas en los gránulos de almidón de jinicuil. Los poros y grietas hubiesen permitido la fácil penetración del agua en los gránulos para la hidratación, hinchamiento y lixiviación del almidón (Fan Zhu *et al.*, 2018).

A 90 °C, un alto valor de capacidad de retención de agua con respecto al almidón de maíz (Figura 6.7) podría atribuirse a un mayor número de sitios de unión disponibles para el agua en los gránulos de almidón de la semilla de jinicuil, lo que influye en el proceso de gelatinización, ya que este proceso requiere una interacción entre las moléculas de agua y el almidón (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019). Esto es atribuido al tamaño pequeño de los gránulos de almidón de jinicuil, como se observó por MEB (Figura 6.1) y DTP (Figura 6.3), lo cual le da una mayor área de contacto.

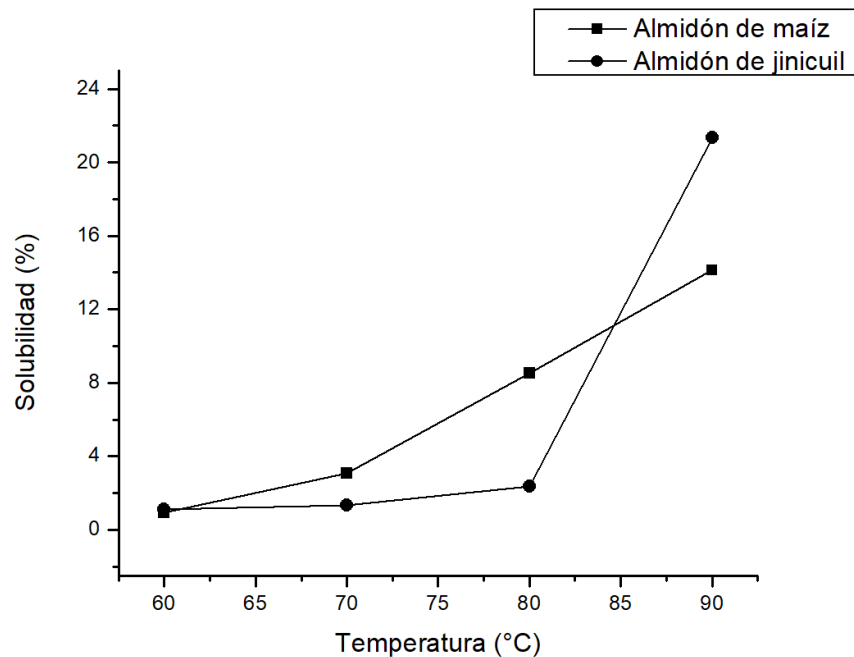


Figura 6.7 Porcentaje de solubilidad del gránulo de almidón.

6.2.3.7 Estabilidad en congelamiento-deshielo y refrigeración

La estabilidad de congelamiento-deshielo y refrigeración consiste en evaluar el porcentaje de sinéresis como consecuencia de la reorganización de la amilosa y la amilopectina del gránulo de almidón (Pérez-Pacheco *et al.*, 2014). Se observó que el gel que se forma con el almidón de jinicuil es estable bajo estas condiciones, ya que al



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

someterlos a diferentes ciclos de congelamiento-deshielo y refrigeración, el porcentaje de sinéresis no va en aumento, sino que se mantiene estable a partir del segundo ciclo (Figura 6.8). Estos resultados difieren de lo reportado por Clemente-Granados *et al.*, (2014) y Zortéa-Guidolin *et al.*, (2017), quienes observaron un incremento de la sinéresis del 2% al 10%, y del 34.1% al 73.0 % para almidones de Sagu (*Maranta arundinacea*) y de semilla de pino brasileño (*Araucaria angustifolia*), respectivamente. La disminución del porcentaje de sinéresis durante el almacenamiento puede atribuirse a una mayor interacción entre las cadenas de amilosa y amilopectina, las cuales a su vez se unen con las moléculas de agua a través de puentes de hidrogeno, lo que permite un incremento en la estabilidad de soluciones de almidón durante el congelamiento y la refrigeración (Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017). Los almidones con bajo porcentaje de sinéresis durante ciclos de refrigeración pueden ser utilizados en productos para relleno de pasteles, pastas, alimentos para bebés, y en condiciones de congelamiento en helados y paletas. (Hernández- Medina *et al.*, 2008).

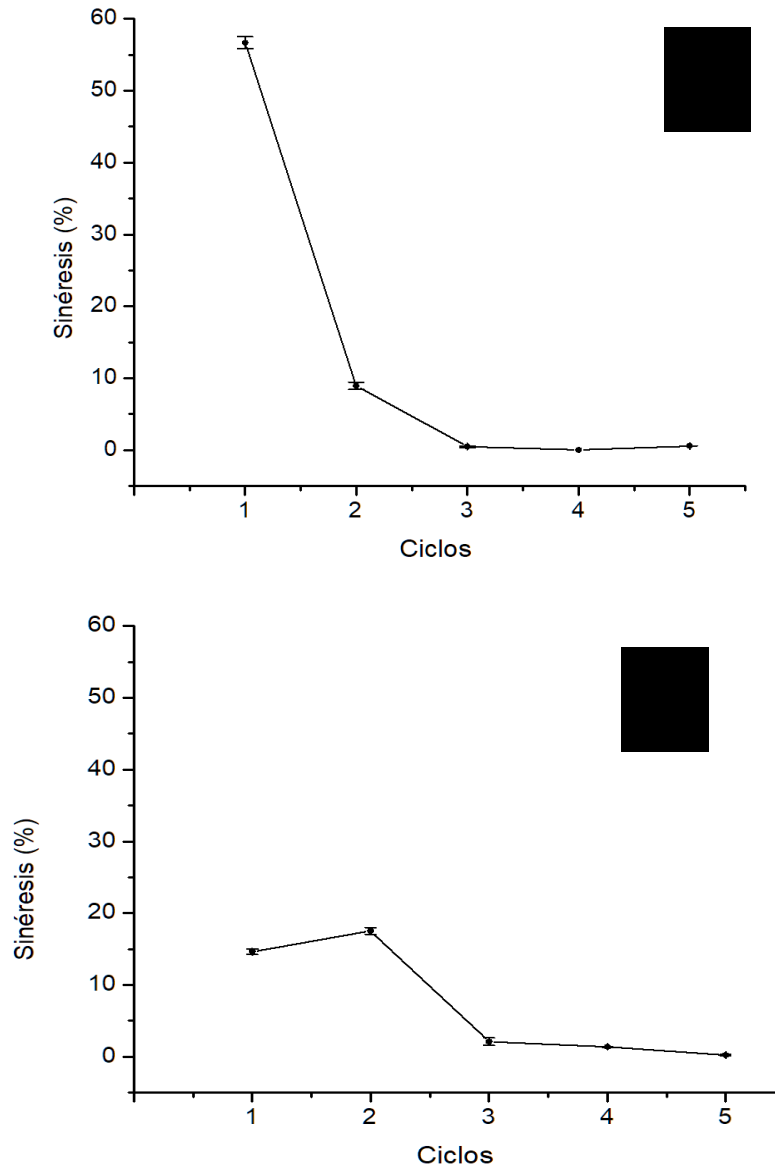


Figura 6.8 Porcentaje de sinéresis del almidón de jinicuil. **a)** Refrigeración y **b)** Congelación



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6.2.4 Síntesis de resultados sobre caracterización del almidón de jinicuil

De acuerdo con la caracterización del almidón de la semilla de jinicuil, se observó que este es un gránulo de almidón pequeño con alto contenido en proteína y lípidos, que se clasifica como un almidón normal de acuerdo con la proporción de amilosa y amilopectina, que muestra un patrón de difracción tipo A y un porcentaje de cristalinidad bajo. Estas características se relacionan con el pico máximo de viscosidad que se obtiene a los 90 °C, que concuerda con la temperatura de gelatinización. De acuerdo con estos últimos resultados, este almidón se puede someter a tratamientos térmicos de hasta 90 °C, sin comprometer la estructura granular del almidón de jinicuil. Debido a su estabilidad bajo condiciones de refrigeración y congelamiento-deshielo, el gel formado con este almidón puede ser utilizado en productos de panificación, pastas, alimentos para bebés, pasteles helados, paletas y helados.

En condiciones nativas, por el tamaño de partícula y por la presencia de proteína, el almidón de jinicuil podría utilizarse directamente para la microencapsulación de compuestos bioactivos mediante secado por aspersión. Mientras que, por su tamaño y perfil de viscosidad, el almidón nativo de jinicuil no podría destinarse a la nanoencapsulación de compuestos bioactivos mediante la misma técnica citada arriba, para ello sería necesario realizar primeramente modificaciones físicas, químicas y/o enzimáticas. A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos en las modificaciones física, química y dual del almidón de jinicuil, propuestas en este proyecto.

6.3 Caracterización de almidones de semilla de jinicuil modificados mediante molienda mecánica

Se estudió primeramente la modificación del almidón de jinicuil mediante diferentes condiciones de micronización (molienda mecánica de alta energía), con el fin de establecer las condiciones que permitieran obtener el menor tamaño de partícula posible. A continuación, se presenta la caracterización de los almidones modificados físicamente en función de sus propiedades térmicas, comportamiento reológico y análisis fisicoquímicos.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

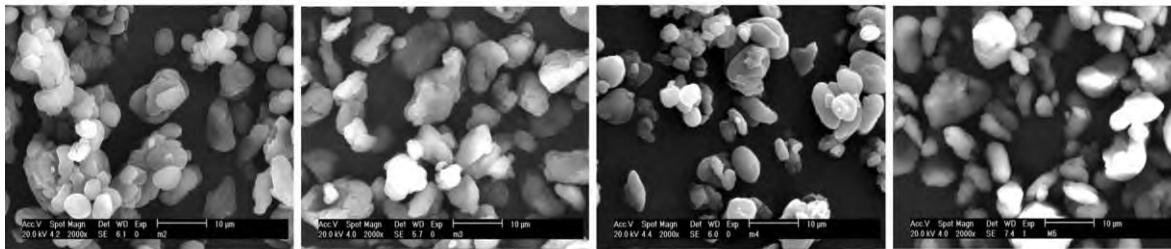
CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6.3.1 Características morfológicas

6.3.1.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las morfologías de los gránulos de almidón de jinicuil modificados por molienda a diferentes condiciones se presentan en la Figura 6.9. Los gránulos de almidón nativo de jinicuil presentaron formas esféricas ovaladas, con superficies lisas (Figura 6.1), a través de MEB se confirmó que dicha morfología se afectó por la molienda de alta energía (Figura 6.9). Los almidones modificados físicamente en el presente proyecto presentaron superficies irregulares, con estructuras distorsionadas, esto coincide con lo reportado para los gránulos de almidón de zanahoria peruana y de yuca, los cuales también presentaron formas irregulares después de su modificación por molienda mecánica (Morales *et al.*, 2012). De acuerdo con las micrografías obtenidas por MEB, los gránulos de almidón se rompieron en pequeños tamaños de partículas, sin embargo, se adhirieron unos a otros hasta formar aglomerados de mayor tamaño (Figura 6.9). Como se reporta en la siguiente sección, este comportamiento se confirmó cuando se analizó la distribución del tamaño de partícula de los almidones modificados bajo diferentes tratamientos de molienda de alta energía.

a) 28 xg



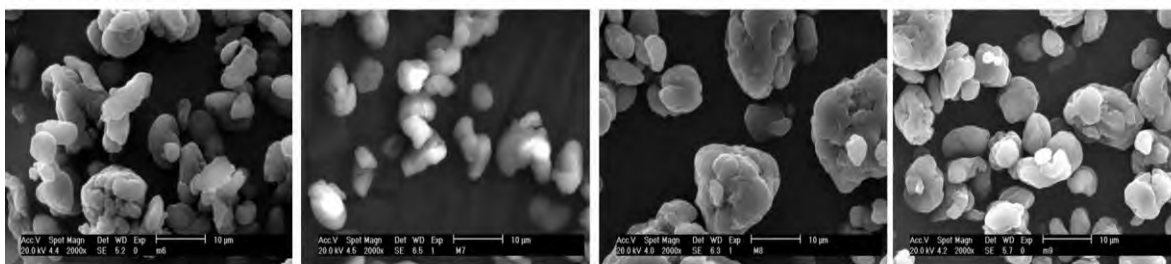
50 min

60 min

70 min

80 min

b) 38 xg



50 min

60 min

70 min

80 min

Figura 6.9 Microscopia electrónica de barrido de almidones modificado por molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y diferentes tiempos.

6.3.1.2 Distribución de tamaño de partícula (DTP)

Las distribuciones de tamaño del gránulo de almidón de jinicuil obtenidas a diferentes condiciones de molienda se muestran en la Figura 6.10. A 28 xg se observan diferencias en el volumen de distribución de tamaño de partícula de acuerdo con el tiempo de molienda (Figura 6.10a). Sin embargo, a 38 xg el comportamiento en la DTP es homogéneo, es decir, es independiente del tiempo (Figura 6.10b), debido a que en esta última condición el gránulo está sujeto a mayor compresión, impacto, cizalla y desgaste, lo que causa daño físico a los gránulos desde los primeros minutos de tratamiento. La distribución homogénea que se obtuvo en el presente trabajo (Figura 6.10b), se relaciona con lo reportado por Roa *et al.*, (2015), quienes determinaron el efecto de la energía durante la molienda mecánica sobre las propiedades reológicas y térmicas de la harina de amaranto; en el trabajo citado se obtuvieron tamaños de partículas desde 880 µm hasta 70 µm, dependiendo de la energía que se generó en el molino; los autores indican que las muestras eran más homogéneas entre mayor energía se aplicara.

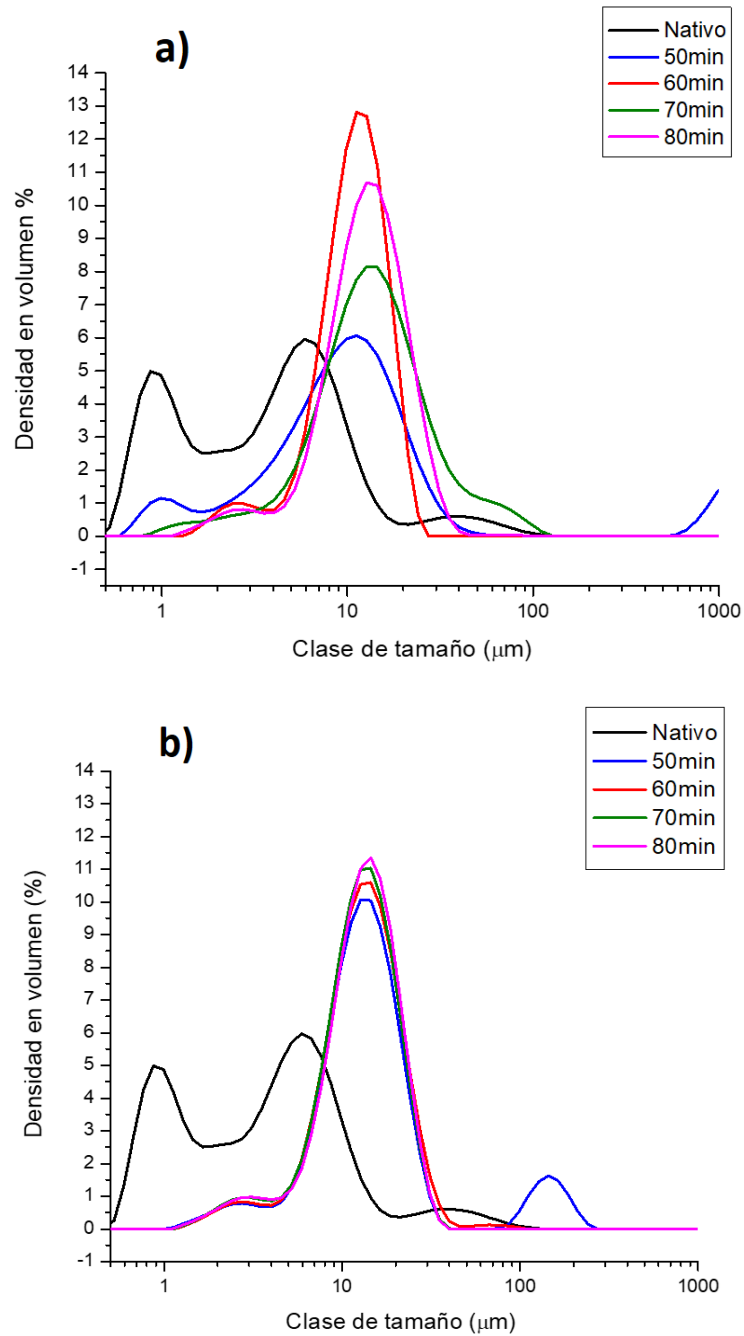


Figura 6.10 Distribución del tamaño del gránulo de almidones nativos y modificados de semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*) mediante molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y diferentes tiempos.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En términos generales, se observó un incremento del tamaño de partícula con el tratamiento de molienda mecánica en comparación con el tamaño del gránulo de almidón nativo de la semilla de jinicuil, independientemente de las condiciones evaluadas (Figura 6.10). Estos resultados son similares a lo reportado por otros autores (Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2012; He *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2019), quienes sugieren que el incremento del tamaño de partícula podría estar asociado a los fenómenos mecánicos involucrados durante la molienda con bolas y a la composición del almidón. La molienda mecánica se divide generalmente en dos etapas: etapa de molienda y etapa de activación mecánica. Durante la etapa de molienda, las fuerzas mecánicas están en equilibrio dinámico, lo cual permite que ocurra la transición de gránulos duros a frágiles, la duración de esta etapa dependerá del tamaño del gránulo y su naturaleza. La siguiente etapa (activación mecánica) ocurrirá a partir de una disminución crítica del tamaño del gránulo, la cual permitirá una transición de gránulos fragmentados a gránulos aglomerados, este fenómeno ocurre debido a que los gránulos más pequeños se adhieren a la superficie de los gránulos más grandes, lo cual origina estructuras distorsionadas con mayores tamaños de partícula (Liu *et al.*, 2011; He *et al.*, 2014).

Además, los contenidos de humedad (7.81%) y proteína (20.93%) del almidón nativo de jinicuil podrían favorecer el incremento del tamaño del gránulo durante el proceso de molienda mecánica. El agua podría cumplir un papel plastificante que permitiría la gelatinización del almidón (Zhang *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2019). Zhang *et al.*, (2010) observaron que a bajas humedades del almidón (0.95-1.20%) se consiguió la disminución del tamaño de partícula, mientras que a mayor contenido de humedad (11.05%) se obtuvieron partículas más grandes. Por otra parte, el contenido de proteína podría contribuir a la formación de aglomerados con alto grado de cohesividad, debido a los puentes de hidrógeno, las fuerzas electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals involucradas (Montalvo, 2012).

6.3.2 Propiedades Fisicoquímicas

6.3.2.1 Perfil de Pasting

Los perfiles de viscosidad de los almidones modificados de la semilla de jinicuil mediante molienda mecánica se observan en la Figura 6.11. Se observaron diferencias en



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

el comportamiento obtenido entre el almidón nativo y los almidones modificados. El pico de viscosidad disminuyó de 1830 cP para el almidón nativo bajo estudio hasta un intervalo de 900 a 1300 cP para los almidones modificados, las viscosidades menores se alcanzaron a 38 xg. Lo anterior sugiere que la modificación física conduce a un cambio considerable en las propiedades reológicas del almidón nativo de jinicuil. Esto resulta atractivo para la aplicación del almidón modificado como material de pared mediante secado por aspersion, pues al disminuir la viscosidad se pueden alcanzar tamaños de gotas menores durante la atomización, y en consecuencia se podrían obtener microcápsulas (John & Sons, 2015). Sin embargo, no se alcanzó la viscosidad requerida (< 10 cP) para producir nanocápsulas mediante secado por aspersion (Büchi, 2002). Resultados similares fueron observados por Zhang *et al.*, (2010) y Moraes *et al.*, (2012), quienes reportaron una disminución en el pico máximo de viscosidad. Estos autores también observaron que se conservó el patrón de perfil de viscosidad característico de los almidones, como en el presente proyecto (Figura 6.11). Esto está asociado a que después del proceso de molienda todavía existen gránulos intactos que aún poseen la capacidad de retención de agua (Moraes *et al.*, 2012).

Huang *et al.*, (2007) quienes estudiaron el efecto del tiempo de molienda sobre los parámetros térmicos del almidón de arroz y el almidón de yuca, reportan que el tiempo de molienda es un factor importante ya que hay una disminución de la temperatura de gelatinización en los almidones y menor pico de viscosidad conforme se incrementa el tiempo de molienda, debido a la energía generada durante el proceso (Roa *et al.*, 2015). Zhang *et al.*, (2010) y Moraes *et al.*, (2012) observaron cambios en el pico de viscosidad a partir de 16 y 5 h de molienda, respectivamente. Estos tiempos de molienda son mayores a los evaluados en el presente trabajo, en donde desde 50 hasta 80 min ya se observaron cambios en el pico de viscosidad. Esto podría estar asociado a las diferencias en densidad y tamaño de las bolas, el número de bolas utilizadas y la relación masa de las bolas-masa de la alimentación (Martínez-López, 2018).

La temperatura a la cual se alcanza el pico máximo de viscosidad no se afectó por las condiciones de molienda mecánica evaluadas en el presente trabajo (Figura 6.11). Estos resultados no coinciden con lo observado por Moraes *et al.*, (2012) y Zhang *et al.*, (2010), quienes reportan una disminución en dicha temperatura. Los resultados obtenidos sugieren que se conserva la estabilidad térmica de los gránulos de almidón de las semillas de jinicuil,

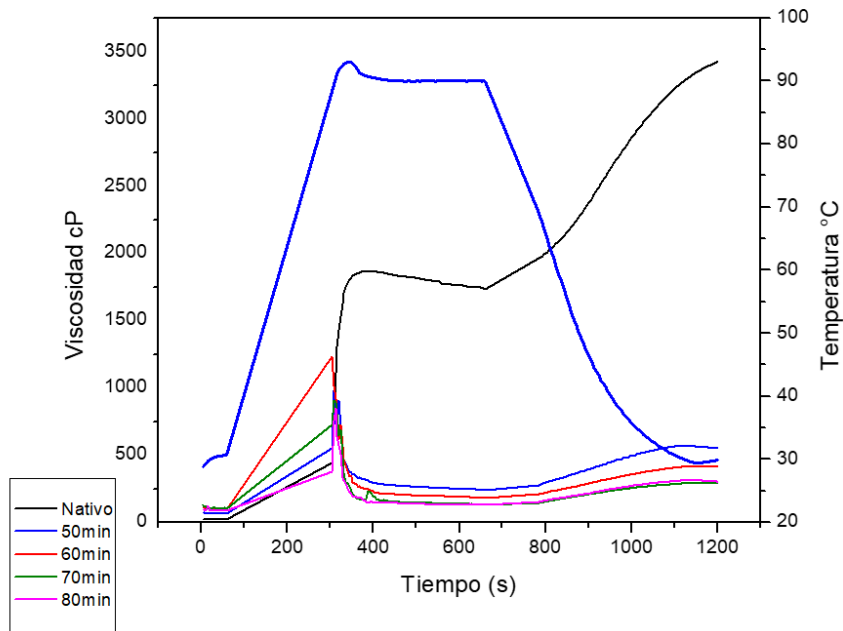


UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ya que la presencia del perfil de Pasting característico de los almidones nos indica que no se dañó el orden molecular del gránulo de almidón.

a)



b)

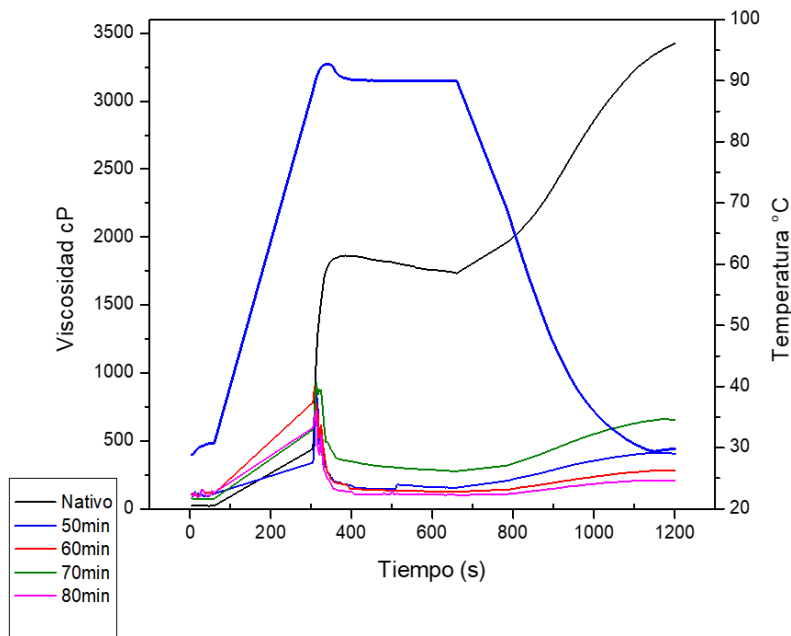


Figura 6.11 Perfil de viscosidad de almidones modificados de semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*) mediante molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y bajo diferentes tiempos.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6.3.2.2 Temperatura y entalpía de gelatinización

Las propiedades térmicas pertenecientes a los almidones modificados por molienda mecánica se presentan en la Tabla 6.4. Donde se observó que el almidón modificado por la molienda a 28 xg por 50 min fue el único que presentó temperatura y entalpía de gelatinización, lo cual sugiere que este tratamiento fue el menos agresivo sobre la estructura cristalina del almidón nativo de jinicuil. Las propiedades térmicas, en especial, la entalpía de gelatinización se relaciona con el porcentaje de cristalinidad y la organización de esta región (Genkina *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). De acuerdo con lo observado por DRX (Figura 6.12), se confirma que las condiciones evaluadas de molienda mecánica afectaron la zona cristalina, en consecuencia, se aumentaron las áreas amorfas y se afectaron las propiedades térmicas de los gránulos. Resultados similares han sido reportados por otros autores cuando realizaron la modificación mecánica de almidones de distintas fuentes (Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2012; Martínez-López, 2018). La disminución de la entalpía a comparación del almidón nativo también se asocia a los gránulos de forma irregular que se producen después de la molienda mecánica, esto es debido a que se afecta la zona cristalina del almidón (Singh & Singh 2003; Kaur *et al.*, 2002 y Martinez *et al.*, 2013).

Tabla 6.4 Temperaturas de gelatinización de almidones modificados bajo diferentes tratamientos de molienda mecánica de alta energía.

Tratamiento	Temperatura de inicio (°C)	Temperatura de gelatinización (°C)	Temperatura final (°C)	Entalpía de gelatinización (J/g)
Almidón nativo	84.53 ± 0.05 ^a	87.85 ± 0.05 ^b	98.02 ± 0.14 ^a	15.27 ± 0.33 ^a
28 xg - 50 min	84.97 ± 0.10 ^a	89.60 ± 0.15 ^a	97.43 ± 0.16 ^b	13.51 ± 0.26 ^b
28 xg - 60 min	NP	NP	NP	NP
28 xg - 70 min	NP	NP	NP	NP
28 xg - 80 min	NP	NP	NP	NP
38 xg - 50 min	NP	NP	NP	NP
38 xg - 60 min	NP	NP	NP	NP
38 xg - 70 min	NP	NP	NP	NP
38 xg - 80 min	NP	NP	NP	NP

*Los valores corresponden a la media de tres repeticiones ± error estándar. Los valores en columnas que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$). NP: No presentó.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Los resultados obtenidos en el presente proyecto concuerdan con lo reportado por Han et al., (2007) y Huang et al., (2007), quienes informaron sobre la disminución de los parámetros térmicos con un aumento del tiempo de molienda cuando estudiaron el efecto del tiempo de molienda sobre los parámetros térmicos del almidón de arroz y de yuca, respectivamente.

6.3.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 6.12 se pueden observar los patrones de DRX del almidón nativo de jinicuil y de los almidones modificados mediante molienda mecánica. La intensidad de los picos de difracción disminuyó parcialmente a partir de 60 min a 28 xg (Figura 6.12a) y a partir de 50 min a 38 xg (Figura 6.12b), esto indica que la cristalinidad del gránulo de almidón disminuyó conforme se aumentó el tiempo de molienda, esto coincide con otros reportes donde uno de los efectos de la molienda mecánica sobre los almidones es la reducción de su cristalinidad con el consecuente aumento de las áreas amorfas (Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2012; Martínez-López, 2018). La fuerza mecánica ocasiona la destrucción de la estructura del gránulo, la relajación de los grupos cristalinos y la modificación en la disposición de la amilopectina-amilosa, en consecuencia, se originan distorsiones y defectos en los cristales (Zhang *et al.*, 2010; Urzúa-Valenzuela, 2018). Esto confirma el comportamiento observado durante el análisis del perfil de viscosidad de los almidones modificados (Figura 6.11), donde la disminución en el pico máximo de viscosidad se asocia con la disminución de las zonas cristalinas del gránulo de almidón (Figura 6.12), esta relación entre el índice de cristalinidad y la viscosidad máxima ha sido reportada por otros autores (Zhang *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2012).

A partir de 50 min a 38 xg, las estructuras cristalinas de los almidones bajo estudio básicamente desaparecen, alcanzando índices de cristalinidad de 3.69 % (50 min-38 xg) a 1.67% (80 min-38 xg), valores inferiores al índice de cristalinidad del almidón nativo (23.18%). Los tiempos de molienda mecánica para dañar la estructura cristalina del gránulo de almidón de jinicuil son menores a lo reportado para modificaciones de los almidones de arroz (Zhang *et al.*, 2010), de maíz (Liu *et al.*, 2011), de yuca y zanahoria (Moraes *et al.*, 2012). Estas diferencias en los tiempos podrían estar asociadas a las distintas condiciones de molienda: material y densidad de las bolas, número de bolas, relación bola/alimentación,



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

revoluciones, humedad y la propia naturaleza del gránulo. En este último punto, Moraes *et al.*, (2012) sugieren que almidones con bajo contenido de amilosa son más fáciles de dañar debido a que esta fracción podría generar un efecto de protección sobre el gránulo, y entonces se reduciría el impacto sobre la región cristalina.

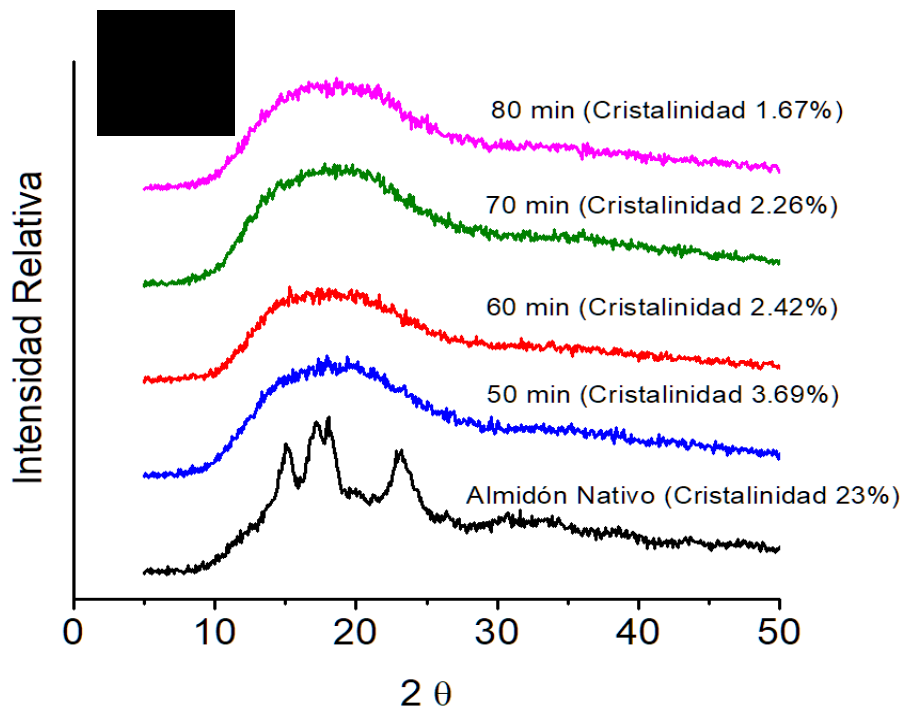
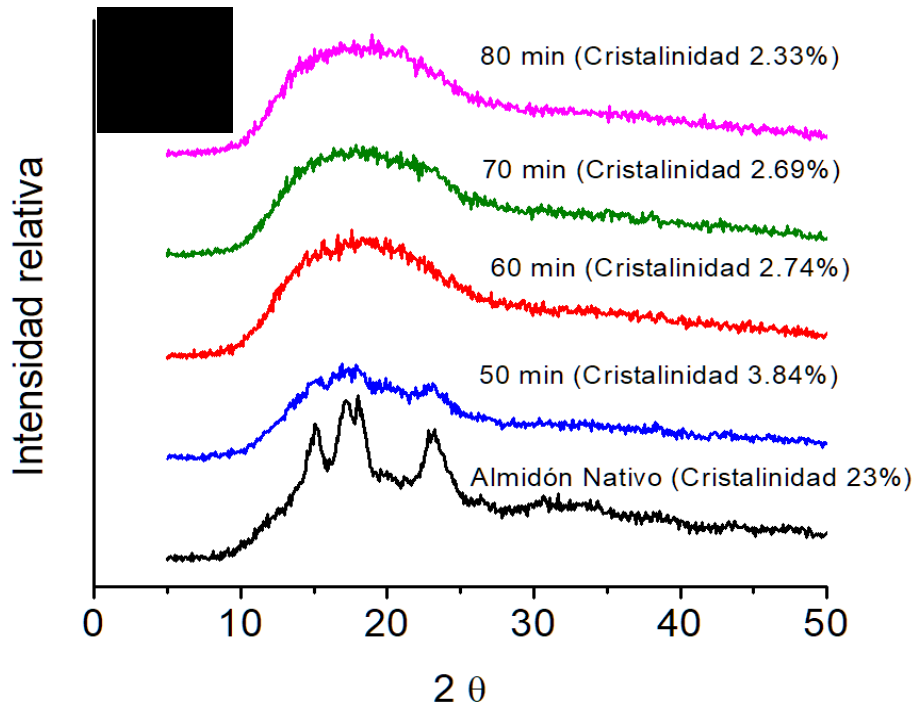


Figura 6.12 Patrón de difracción de rayos X de almidones modificados de semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*) mediante molienda mecánica a 28 (a) y 38 (b) xg y diferentes tiempos.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

6.4 Caracterización de almidones de semilla de jinicuil modificados dualmente

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente sobre la modificación del almidón nativo por molienda mecánica, se seleccionó el tratamiento a 28 xg (600 rpm) por 50 min para realizar la modificación dual (molienda + entrecruzamiento) del almidón de jinicuil. Estas condiciones de molienda mecánica fueron las que presentaron el menor tamaño de partícula y la menor viscosidad en el menor tiempo posible de procesamiento. Los resultados se compararon con el almidón nativo, modificado por molienda y entrecruzamiento individualmente.

6.4.1 Características Morfológicas

6.4.1.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se estudió mediante MEB la morfología y superficie de los almidones modificados bajo los diferentes tratamientos evaluados, los cuales se presenta en la Figura 6.13. Se observó que las modificaciones realizadas al almidón de la semilla de jinicuil proporcionaron partículas de tamaños más grandes con respecto al almidón nativo, esto es debido a la aglomeración que se llevó a cabo entre las partículas. Lo observado por MEB se puede confirmar con los resultados de DTP (Figura 6.14).

En la micrografía del almidón modificado dualmente (Figura 6.13d), se puede observar que algunos gránulos de almidón presentan ligeras abolladuras en la superficie, esto se ha reportado por otros autores y esta característica superficial del gránulo la han asociado a diferentes grados de modificación, y por lo tanto se consiguen diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales (Carmona- García et al., 2009; Koo et al., 2010; Moin et al., 2019). También se pudo observar mayor agregación en las partículas de los almidones modificados dualmente, esto puede sugerir el entrecruzamiento entre el almidón y los agentes entrecruzantes. Carmona-García et al., 2009 reporta que una mayor agregación de los gránulos en los almidones reticulados se debe a la mayor desorganización de los gránulos y lixiviación de amilosa. Debido a la contingencia sanitaria por COVID-19 durante 2020, no se pudo contar con la micrografía del almidón modificado sólo por entrecruzamiento químico, lo cual podría fortalecer esta hipótesis.

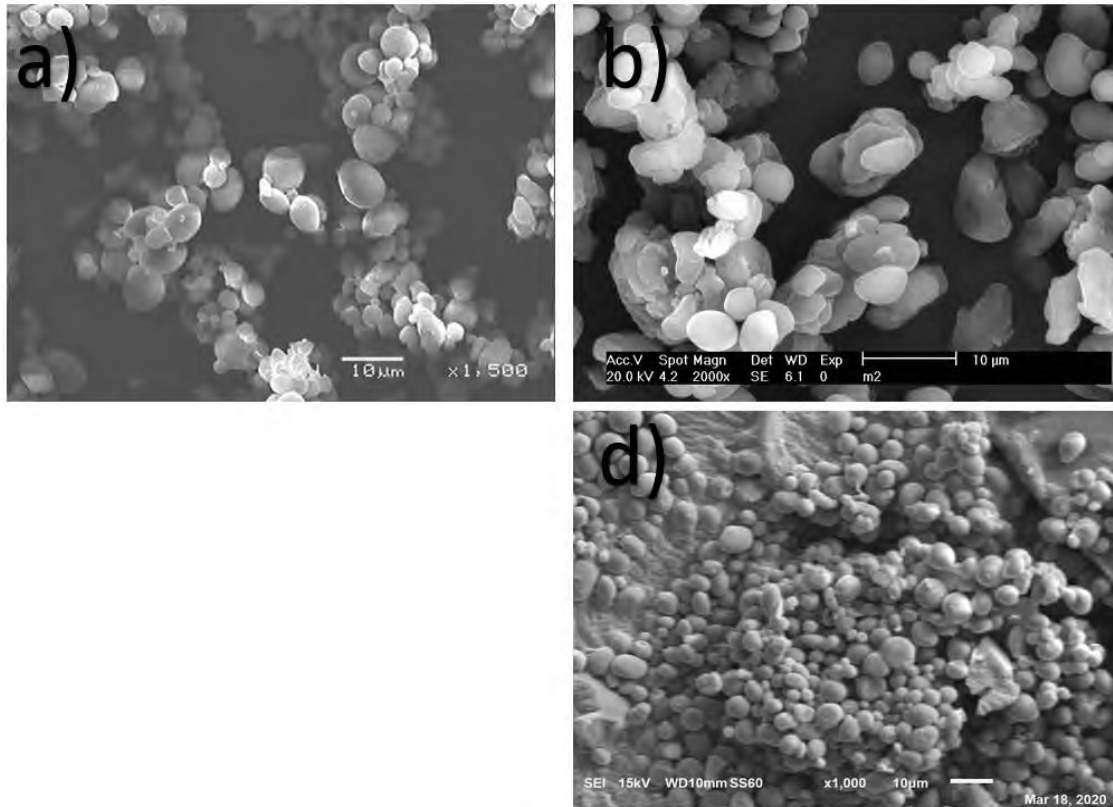


Figura 6.13 Microscopía electrónica de barrido de almidones modificados (a) almidón nativo (b) almidón modificado por molienda (c) almidón entrecruzado (d) almidón dualmente modificado.

6.4.1.2 Distribución de tamaño de partícula (DTP)

En la Figura 6.14 se presenta la distribución de tamaño de partículas de los almidones modificados y del nativo, donde se puede observar que éstos tienen una distribución multimodal. Estos resultados manifiestan un aumento en el tamaño de partícula en todas las modificaciones evaluadas. Como se discutió anteriormente, la molienda mecánica aumentó el tamaño de partículas, lo cual se atribuye al contenido de humedad y de proteína del almidón, y como una de las consecuencias de la molienda mecánica de alta energía. En el caso del entrecruzamiento y la modificación dual, el incremento del tamaño de las partículas se atribuye a la mayor interacción intra o inter molecular de los almidones y los grupos de fosfato (Cai *et al.*, 2019), lo cual fomentaría la formación de agregados en estas modificaciones.

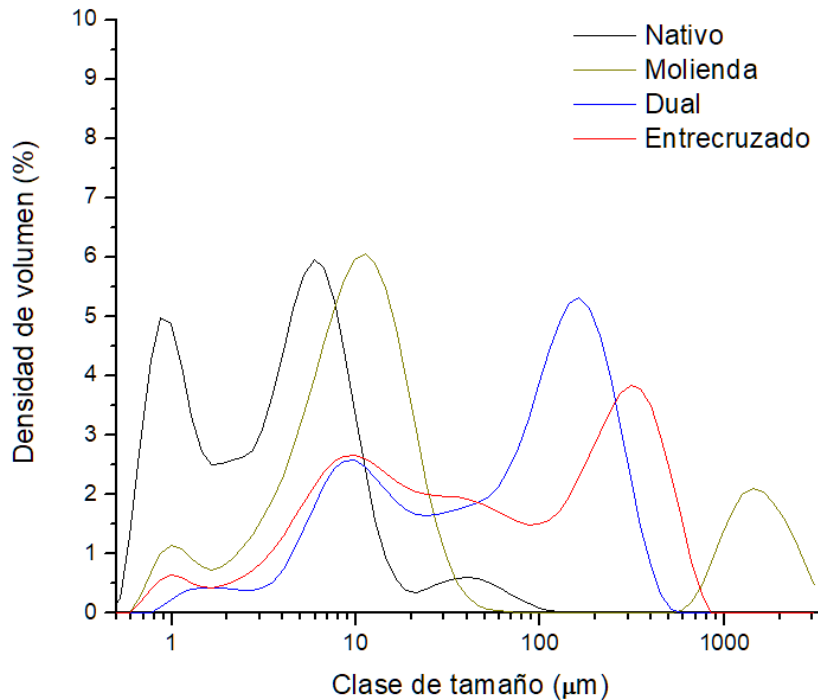


Figura 6.14 Distribución de tamaño de partícula de almidones nativos y modificados de la semilla de jinicuil.

6.4.2 Propiedades fisicoquímicas.

6.4.2.1 Perfil de Pasting

Las modificaciones físicas y químicas conducen cambios distintos en las propiedades reológicas de los almidones. La viscosidad del almidón puede ser incrementada o disminuida mediante la aplicación de una modificación u otra (Sánchez-Rivera 2018). En los perfiles de viscosidad obtenidos en este trabajo se observaron diferencias entre el comportamiento obtenido para el almidón nativo, modificado por molienda, por entrecruzamiento y para el dualmente modificado, estos dos últimos presentaron menor viscosidad durante el perfil completo (Figura 6.15).

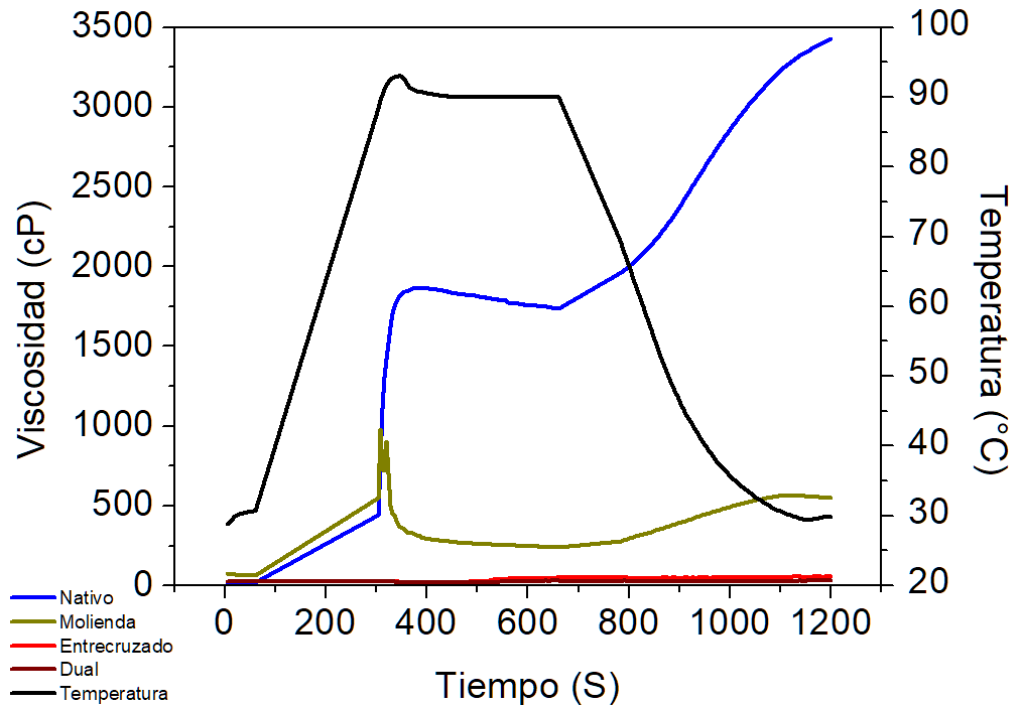


Figura 6.15 Perfil de viscosidad de los almidones modificados.

Como se ha discutido anteriormente, en el almidón modificado físicamente se puede observar una disminución en el pico máximo de viscosidad en comparación con el almidón nativo, pero se conserva el patrón de perfil de viscosidad característico de los almidones, asociado a la presencia de gránulos aún intactos. Sin embargo, en el caso de los almidones modificados química y dualmente, no se puede observar un perfil de viscosidad característico de los almidones, esto es debido a que los enlaces cruzados logran estabilizar la estructura granular del almidón, impidiendo su interacción con el agua. Este comportamiento coincide con lo reportado por Cai *et al.*, (2019) y Fan *et al.*, (2019). Con estos resultados se puede asegurar que la modificación química fue la principal responsable de disminuir considerablemente la viscosidad del almidón nativo.

Los resultados del perfil de viscosidad de los almidones modificados se correlacionan con el comportamiento observado en la difracción de rayos X (Figura 6.16), pues la disminución en el pico máximo de viscosidad de los almidones modificados se asocia con la disminución de las zonas cristalinas de sus gránulos (Figura 6.15 y 6.16), esta relación



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

entre el índice de cristalinidad y la viscosidad máxima ha sido reportada por otros autores (Moraes et al., 2012).

6.4.2.2 *Temperatura de gelatinización*

La gelatinización del almidón es el colapso del orden molecular dentro del gránulo, con cambios irreversibles en sus propiedades como hinchamiento granular, fusión cristalina, pérdida de la birrefringencia, aumento de la viscosidad y solubilidad del gránulo (Singh *et al.*, 2007). La temperatura de gelatinización y entalpía del almidón nativo y modificados se presenta en la Tabla 6.5. La entalpía de gelatinización de los almidones modificados disminuyó en comparación con el almidón nativo, esto se relaciona con la cristalinidad, entre más alto sea el porcentaje de cristalinidad mayor entalpía se presentará (Li *et al.*, 2013). Como se observa en la Figura 6.16, el mayor porcentaje de cristalinidad lo presentó el almidón nativo, y también presentó la mayor entalpía de gelatinización (Tabla 6.5). Esto indica que se requiere de menor cantidad de energía para que se lleve a cabo el desdoblamiento de las dobles hélices en los almidones modificados.

Por otro lado, para el almidón entrecruzado mostró una temperatura de gelatinización más alta que la del almidón nativo de jinicuil (Tabla 6.5), lo cual puede deberse a que el entrecruzamiento estabilizó la estructura del gránulo, requiriendo mayor temperatura para llevar a cabo la gelatinización (Liu *et al.*, 2014). La temperatura de gelatinización del almidón modificado químicamente resulta del grado de reticulación o sustitución, es decir, del efecto de fortalecer los enlaces entre las cadenas de almidón (Gałkowska & Juszczak 2019). Mientras que el aumento en la temperatura de gelatinización del almidón modificado por molienda con respecto al del almidón nativo, puede asociarse al tamaño mayor de gránulo del almidón modificado (Figura 6.14).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tabla 6.5 Temperaturas de gelatinización de almidón nativo y modificados de jinicuil.

Material de pared	Temperatura de inicio (°C)	Temperatura de gelatinización (°C)	Temperatura final (°C)	Entalpía de gelatinización (J/g)
Nativo	84.53 ± 0.05 ^b	87.85 ± 0.05 ^c	98.02 ± 0.14 ^a	15.27 ± 0.33 ^a
Molienda	84.97 ± 0.10 ^b	89.60 ± 0.15 ^b	97.43 ± 0.16 ^{ab}	13.51 ± 0.26 ^b
Entrecruzado	87.71 ± 0.24 ^a	91.95 ± 0.70 ^a	96.45 ± 0.70 ^b	4.46 ± 0.31 ^c
Dual	NP	NP	NP	NP

*Los valores corresponden al valor de la media de tres repeticiones ± error estándar. Diferentes letras en una columna significan diferencias significativas ($p < 0.05$). **NP**: No presentó

6.4.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 6.16 se presenta el patrón de DRX de los almidones modificados y del nativo, donde se puede observar una disminución en la intensidad de los picos de difracción, lo cual nos indica que la cristalinidad del gránulo de almidón disminuyó con los diferentes tratamientos de modificación estudiados. Estos resultados coinciden con los reportados por Cai *et al.*, (2019) y Fan *et al.*, (2019).

Sin embargo, en el almidón entrecruzado el patrón de difracción no cambió, esto se atribuye a que el entrecruzamiento dentro de los gránulos de almidón ocurre principalmente en las zonas amorfas, probablemente debido a que las zonas amorfas son más flexibles y disponibles para el entrecruzamiento (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2006). Esto concuerda con lo reportado por Aparicio-Trapala (2003), quién reportó que el patrón de difracción de los almidones entrecruzados de yuca y camote no mostraron diferencias en comparación con el patrón del almidón nativo. Este autor sugiere que esto ocurre debido a que los grupos fosfatos se unieron en las regiones amorfas del gránulo.

A pesar de que se conserva el patrón de DRX en el almidón entrecruzado, sí se observa una disminución en el porcentaje de cristalinidad con respecto al almidón nativo (Figura 7.16). Cai *et al.*, (2019), reportaron que una disminución en la cristalinidad de los almidones modificados químicamente se debe a que la reacción de entrecruzamiento puede ocurrir también en regiones cristalinas de los gránulos del almidón, con la sustitución de inter e intra enlaces de hidrógeno por grupos fosfatos. Por lo tanto, esto podría justificar la

disminución de la cristalinidad del almidón modificado por entrecruzamiento y del dualmente modificado (Figura 6.16). Estos resultados coinciden con lo observado en el perfil de viscosidad de estos almidones modificados (Figura 6.15), donde la disminución en el pico máximo de viscosidad se asocia con la disminución de las zonas cristalinas del gránulo de almidón (Figura 6.16), como ya se ha discutido anteriormente.

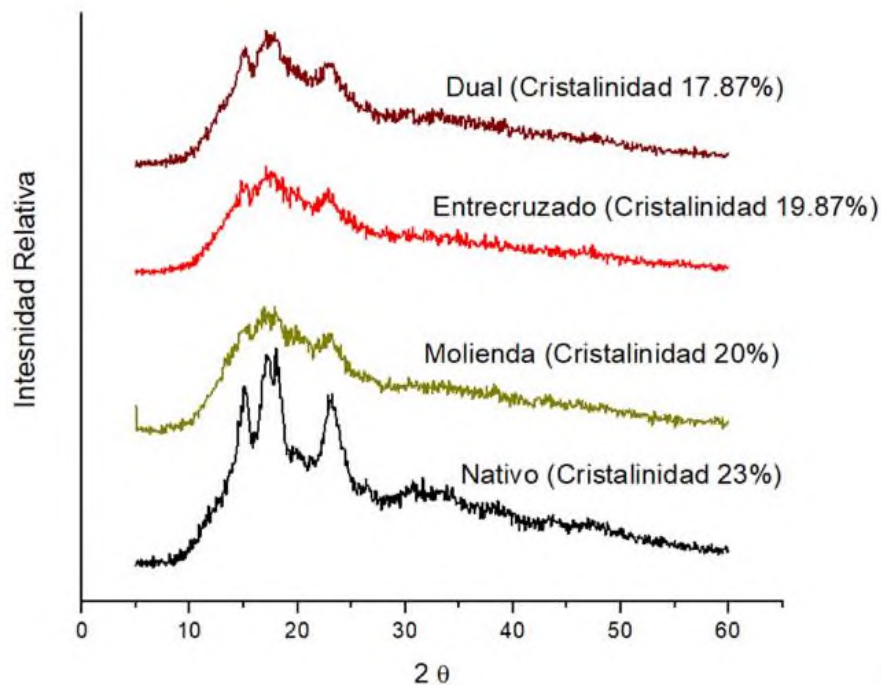


Figura 6.16 Patrón de difracción de rayos X de almidón modificado de semillas de jinicuil (*Inga jinicuil*) mediante entrecruzamiento, molienda y dualmente.

6.4.2.4 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó la espectroscopía infrarroja para confirmar los cambios en la estructura química del almidón de jinicuil como resultado de la modificación química propuesta. Los espectros del almidón nativo, almidón entrecruzado y dualmente modificado se presentan en la Figura 6.17. Sin embargo, no se lograron detectar cambios significativos en el patrón de espectroscopía FTIR de los almidones modificados, comparándolos con el nativo. Se encontraron señales características de la molécula del almidón, los picos a 2945 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento C-H, mientras que la banda extremadamente ancha que aparece

a 3300 cm^{-1} se asocia con las vibraciones de estiramiento del grupo hidroxilo (Sánchez-Rivera 2018).

De acuerdo con la estructura química del STMP y la vibración de estiramiento de los compuestos de éster de fosfato, existe una banda de absorción para P-O-C a 810 cm^{-1} (Sánchez-Rivera 2018) y para el enlace P=O a 1210 cm^{-1} (Trommer *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2011), pero estos picos no fueron detectados en el espectro de las muestras del almidón entrecruzado y dual, esto podría deberse a la sensibilidad del equipo y a la concentración tan baja utilizada de agente entrecruzante. Probablemente las señales quedan inmersas y se solapan con las señales del almidón, observándose iguales, tal y como lo reportaron Gao *et al.*, (2014) previamente. Sin embargo, en los almidones modificados se evaluaron sus propiedades por DRX, perfil de viscosidad y DSC, pruebas que permitieron observar que los gránulos modificados presentaron diferentes propiedades en comparación con las del almidón nativo, por lo tanto, la modificación química sí se llevó a cabo.

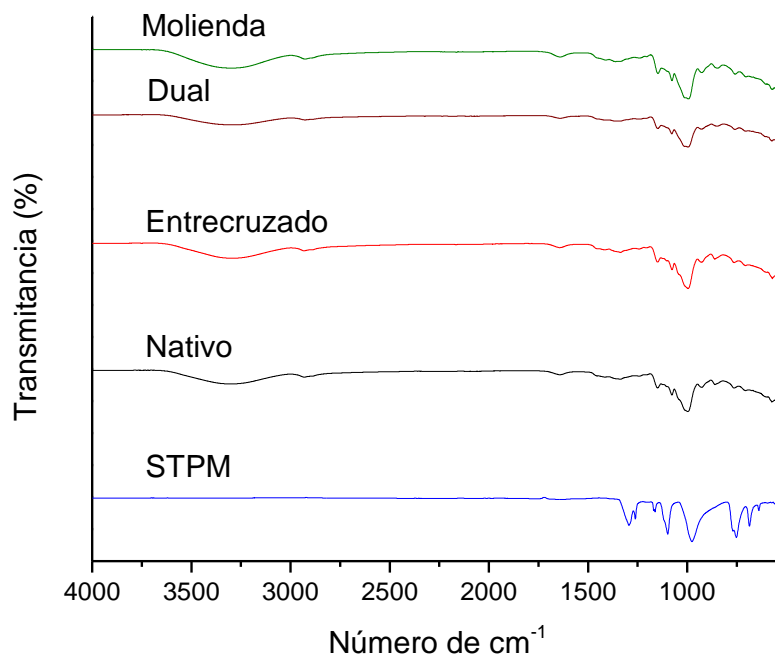


Figura 6.17 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier del agente entrecruzante, del almidón nativo y de los almidones modificados.



6.5 Caracterización de las cápsulas obtenidas mediante secado por aspersión

Con el fin de evaluar sus propiedades como materiales de pared, el almidón nativo de jinicuil y los modificados física, química y dualmente, fueron utilizados para encapsular ácido ascórbico mediante secado por aspersión.

6.5.1 Actividad de agua (a_w)

Este parámetro es muy importante para evaluar la seguridad, la calidad de los alimentos y su vida útil (Silva-Faria *et al.*, 2020), ya que el agua libre puede ser utilizada por microorganismos que podrían conducir a factores que contribuyen al deterioro. Las bacterias generalmente requieren al menos 0.91 de a_w y los hongos al menos 0.70; de ahí la importancia de tener valores bajos de a_w (Barra *et al.*, 2019). Los valores de actividad de agua fueron menores a 0.45 a_w , lo cual también nos sugiere que es bajo susceptible a formar aglomerados o endurecimiento de los polvos (Ferrer *et al.*, 2013)

Los resultados mostraron que las micropartículas obtenidas con almidones nativo y modificados de jinicuil tienen un bajo contenido de a_w con valores de 0.24 a 0.43 (Tabla 6.6). Los valores obtenidos fueron más altos que los reportados por Zanonía *et al.*, (2020) quienes utilizaron como material de pared el almidón modificado Capsul® durante la encapsulación de polifenoles mediante secado por aspersión. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron similares a lo reportado para las cápsulas de ácido ascórbico formadas con alginato y goma arábiga mediante secado por aspersión (Barra *et al.*, 2019). En general, valores inferiores a 0.6 inhiben diversas reacciones indeseables como oxidación, reacción de Maillard, acción de enzimas y desarrollo de microorganismos (Da costa *et al.*, 2016).

Los valores más altos de a_w en las cápsulas se obtuvieron con el almidón nativo, y el valor más bajo se logró utilizando como material de pared el almidón modificado por entrecruzamiento, esto se atribuye a la interacción intramolecular de los grupos fosfatos y el almidón logrado por entrecruzamiento químico, lo cual permite disminuir el agua libre (Cai *et al.*, 2019).

Tabla 6.6 Actividad de agua y humedad de las capsulas de almidón de jinicuil (*Inga jinicuil*).

Tratamientos	Actividad de agua (a_w)	Humedad bs (%)
Nativo	0.43 ± 0.02^a	1.75 ± 0.72^c
Molienda	0.35 ± 0.01^b	2.94 ± 0.37^b
Entrecruzamiento	0.24 ± 0.04^c	4.56 ± 0.63^a
Dual	0.36 ± 0.03^b	1.76 ± 0.72^c

*Los valores corresponden al valor de la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.5.2 Humedad

Las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión utilizando como materiales de pared almidones nativo y modificados de jinicuil presentaron diferentes porcentajes de humedad (Tabla 6.6), en un intervalo de 1.75 a 4.56% de humedad base seca. Estos valores fueron similares a lo reportado por Barra *et al.*, (2019), quienes microencapsularon ácido ascórbico con alginato (2.14 - 5.48% H bs) y goma arábiga (1.39 - 5.43% H bs) mediante secado por aspersión (Temp. de entrada, 140 °C; Temp. de salida, 70 °C). Estos autores reportaron un aumento de la humedad en relación con la cantidad de polímero utilizado, entre más material de pared mayor humedad. Este efecto fue más considerable cuando se utilizó alginato, por la naturaleza hidrocoloide intrínseca con alta higroscopicidad. En el presente estudio, la humedad más alta se obtuvo cuando se utilizó el almidón de jinicuil entrecruzado como material de pared, esto podría deberse por el fosfato presente que es hidrofílico y por ende menor a_w , ya que hay menor cantidad de agua libre presente en la cápsula. Los valores de humedad fueron inferiores al 6%, independientemente del material de pared utilizado, lo cual nos indica baja susceptibilidad al ataque por microorganismos y se puede sugerir un almacenamiento prolongado (Abbas *et al.*, 2012).

6.5.3 Análisis morfológicos

6.5.3.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se obtuvieron las micrografías de las partículas obtenidas mediante secado por aspersión con los diferentes materiales de pared evaluados (Figura 6.18), las cuales



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

permitieron evaluar la forma e integridad de las cápsulas obtenidas. La forma de la cápsula está relacionada en gran parte con el material de pared que se utiliza (Palma- Rodríguez, 2012).

Las micrografías mostraron la presencia de partículas con diferentes dimensiones, lo cual concuerda con los resultados de DTP (Figura 6.19), los tamaños de las cápsulas van desde 1 μm hasta 1000 μm , esto va dependiendo del material de pared utilizado, sin embargo, de acuerdo con lo reportado por otros autores, las partículas obtenidas en el presente trabajo se pueden considerar micropartículas, ya que se indica que el intervalo de tamaño de las microcápsulas va de 1 a 5000 μm , mientras que para nanocápsulas es de < 0.2 μm y para macrocápsulas > 5000 μm (Dias *et al.*, 2015; Leyva- López *et al.*, 2019).

Además de los diferentes tamaños observados por MEB, las micrografías muestran partículas aglomeradas de forma irregular y esféricas (Figuras 6.18A, 6.18C y 6.18D). Sepelevs *et al.*, (2018) atribuyen que la adhesión que produce los aglomerados depende de los parámetros utilizados durante el secado por aspersion, ya que temperaturas altas pueden dar un material pegajoso lo cual depende de las propiedades térmicas de éste, y las temperaturas bajas pueden ser poco eficientes y de igual manera generar aglomeraciones. La formación de agregados esféricos también se le ha atribuido al contenido de proteína, debido a que ésta interactúa como agente de unión (Hoyos-Leyva *et al.*, 2018). González-Soto, *et al.* (2011) informaron que el almidón de taro tiene la capacidad de formar agregados esféricos sin la adición de agentes aglutinantes, debido a un contenido relativamente alto de proteína (4.5 g / 100 g), que es suficiente para generar aglomerados esféricos.

En el caso del almidón modificado por molienda mecánica se observaron estructuras colapsadas o abolladas, con partículas pequeñas que se adhirieron entre ellas o con partículas más grandes, esta morfología también fue reportada con almidón modificado CAPSUL® utilizado como material de pared en la encapsulación de polifenoles (Zanoni *et al.*, 2020). Esto podría atribuirse a una baja tasa de alimentación durante el secado o baja cantidad de sólidos, lo que hace que el proceso de secado sea más rápido e implique la obtención de partículas colapsadas y pequeñas (García-Tejeda *et al.*, 2016). También se le atribuye a la temperatura del aire de secado, a bajas temperaturas hay una menor difusión de agua, incrementando el tiempo de secado lo que provoca que la cápsula colapse.

Mientras que, a altas temperaturas del aire la evaporación rápida del agua y la presión alta dentro de la partícula provoca que éstas se colapsen (Palma-Rodríguez, 2012; Castro *et al.*, 2015).

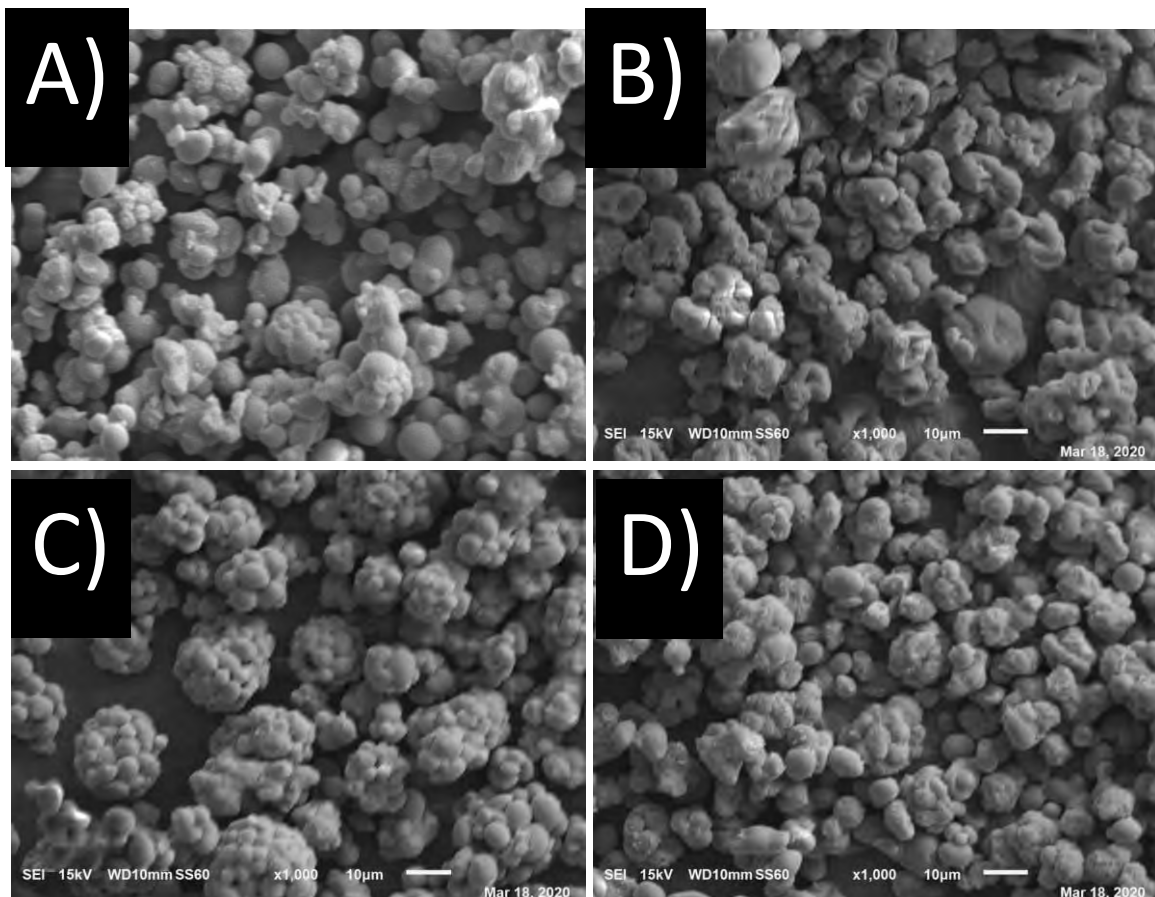


Figura 6.18 Microscopía electrónica de barrido de barrido de capsulas obtenidas con diferentes materiales de pared (a) almidón nativo (b) almidón modificado molienda mecánica (c) almidón modificado por entrecruzamiento (d) almidón modificado dualmente.

6.5.3.2 Distribución del tamaño de partícula (DTP)

La DTP de las cápsulas varió dependiendo del material de pared utilizado, en la mayoría de los materiales se presentó una distribución bimodal a diferencia de cuando se utilizó como material de pared el almidón entrecruzado y el dualmente modificado, los cuales presentaron una distribución multimodal (Figura 6.19).

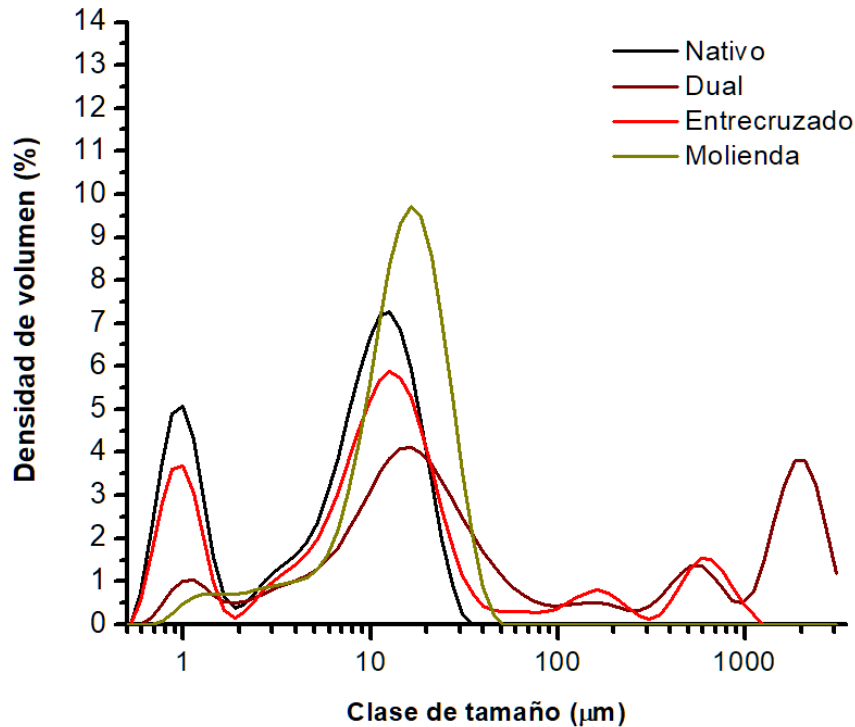


Figura 6.19 Distribución de tamaño de partícula de las capsulas de material de pared de almidón nativo y modificados.

El almidón nativo presentó tamaños de 1 µm a 15 µm, el almidón modificado por molienda mecánica presentó tamaños de 1.5 µm a 20 µm, y los almidones entrecruzado y dualmente modificado presentaron tamaños de 1.5 µm, 15 µm, 150 µm y 800 µm. Estos resultados son similares a los reportados por diferentes autores que obtienen cápsulas mediante secado por aspersion utilizando como materiales de pared maltodextrina GLOBE® 1905 y Capsul Snow Flake® E6131 (Gomes da Costa *et al.*, 2016), goma arábica y alginato de sodio (Barra *et al.*, 2019), maltodextrina y goma arábica (Silva-Faria *et al.*, 2020). La cantidad de sólidos presentes en la mezcla y la viscosidad son factores que influyen en el tamaño de partícula de las cápsulas (Schafroth *et al.*, 2012; Barra *et al.*, 2019). Al tener materiales de pared con viscosidades altas dificulta la atomización de la muestra generando tamaño de partículas mayores, ya que se requiere mayor tensión superficial para formar pequeñas gotas (BÜCHI, 2007). Para facilitar la atomización y proteger el compuesto activo mediante la formación rápida de la película, es importante que



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

el material de la pared muestra bajas viscosidades incluso a altas temperaturas (Gharsallaoui *et al.*, 2007; John Wiley & Sons, 2015).

6.5.4 Eficiencia de encapsulación de ácido ascórbico y rendimiento del proceso

Las micropartículas obtenidas mediante secado por aspersión mostraron diferentes porcentajes de eficiencias de encapsulación, dependiendo del material de pared utilizado (Tabla 6.7) teniendo de 28.28% a 63.55% de eficiencia de encapsulación. En todos los casos, la eficiencia de encapsulación se midió estimando la cantidad de ácido ascórbico tanto en el interior como en la superficie de las micropartículas. El almidón nativo es el que presentó la mayor eficiencia de encapsulación con un 63.55%, resultado similar a lo reportado para almidón modificado Capsul® utilizado como material de pared en la encapsulación de polifenoles, mediante secado por aspersión con temperatura de entrada de 140 °C y de salida de 70 °C (Zanonia *et al.*, 2020). A partir de los resultados de eficiencia de encapsulación, se infiere que la estructura nativa del almidón de jinicuil presenta mayor interacción con el ácido ascórbico con respecto a sus formas modificadas. Zhi-Hong *et al.*, (2020) reportaron que las fuerzas de interacción entre el material de la pared y el material del núcleo pueden beneficiar a la retención de compuestos encapsulados. Otros autores le atribuyen una mejor retención de los compuestos encapsulados por el contenido de proteína que la muestra presente, debido a que ésta tiende a generar aglomerados esféricos, lo que permite que el compuesto bioactivo quede en la parte interior de la cápsula formada, como se observó por MEB (Figura 6.18) (González-Soto *et al.*, 2011).

La eficiencia obtenida en el presente trabajo es menor a lo reportado para cápsulas preparadas con alginato de sodio con 90% de eficiencia, mediante secado por aspersión con temperatura de entrada de 140 °C y de salida de 86 °C, con una dispersión de sólidos de 5 g/L (Barra *et al.*, 2019), sin embargo, las cápsulas de alginato tienen dificultades en su aplicación a nivel industrial, susceptibilidad al ambiente ácido, con pérdida de su integridad y estabilidad mecánica, formación de poros en la superficie de las cápsulas y difusión relativamente rápida de la humedad (Pérez-Leonard *et al.*, 2013).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Las eficiencias más bajas se presentaron cuando se utilizaron como materiales de pared el almidón modificado por entrecruzamiento y con el modificado dualmente, esto se atribuye a que durante la modificación química se generaron agregados en el material de pared, como se observó por MEB (Figura 6.13), lo cual impidió la eficiente encapsulación durante el secado por aspersión. La baja eficiencia también se relaciona con lo que se observó cuando se llevó a cabo la microencapsulación en el secador por aspersión, donde las partículas se quedaron adheridas a la cámara de secado, asociado a que las partículas asperjadas fueron grandes debido a una tensión superficial alta (John Wiley & Sons, 2015).

La cuantificación de los compuestos encapsulados está relacionada con la volubilidad de los materiales, con la interacción polímero-compuesto bioactivo, debido a las interacciones través de grupos funcionales complementarios presentes en el polímero y el activo. Ese tipo de interacciones dan lugar a enlaces puentes de hidrógeno, electrostáticos y en determinados casos, interacciones hidrófobas, impactando directamente sobre la eficiencia de encapsulación e impidiendo al mismo tiempo la transformación de los compuestos a formas menos estables o bien, pérdida de la actividad biológica correspondiente (Moser *et al.*, 2017).

El rendimiento obtenido utilizando los diferentes materiales de pared se presentan en la Tabla 7.7 donde se puede observar una variación de 14.57% a 44.02% de rendimiento. Los valores más altos de rendimientos se obtuvieron cuando se usó almidón modificado físicamente por molienda mecánica. Esto se le atribuye a la viscosidad, debido a que entre mayor viscosidad se requiere una mayor tensión superficial para asperjar la muestra y se obtienen tamaños de partículas mayores, el tiempo de residencia en la cámara de secado es corto (15 s) lo que hace que se genere un material que se adhiera en la pared de la cámara de secado, como se observó durante la parte experimental del trabajo. Barra *et al.*, (2019) relacionaron la cantidad de sólidos totales con el rendimiento de proceso, dado que al utilizar como material de pared alginato para encapsular ácido ascórbico, a medida que aumentaba la concentración de polímero en el sistema, el rendimiento de encapsulación disminuía. Este efecto puede atribuirse al aumento de la viscosidad de las soluciones de alginato, que coincide con lo observado en la Figura 6.5 donde se presenta una disminución de la viscosidad de los almidones modificados por molienda a comparación del almidón nativo. Por otro lado, los bajos rendimientos obtenidos utilizando almidón modificado por



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

entrecruzamiento y con almidón modificado dualmente, se atribuye a lo mencionado anteriormente: la modificación química generó agregados, lo cual dificultó obtener partículas pequeñas, lo cual impidió que éstas se secaran y en consecuencia quedaron adheridas a las paredes del secador, viéndose reflejado en los rendimientos del proceso (BÜCHI, 2007).

Tabla 6.7 Eficiencia de encapsulación de ácido ascórbico y rendimiento de proceso de secado por aspersión.

Tratamientos	Eficiencia de encapsulación (%)	Rendimiento del proceso (%)
Nativo	63.55 ± 2.77 ^a	28.28 ± 0.12 ^b
Molienda	38.57 ± 1.04 ^b	44.04 ± 2.27 ^a
Entrecruzamiento	29.21 ± 2.17 ^b	18.66 ± 1.08 ^c
Dual	28.28 ± 0.91 ^b	14.57 ± 4.04 ^d

*Los valores corresponden a la media de tres repeticiones ± desviación de estándar. Diferentes letras en una columna significan diferencias significativas ($p < 0.05$).



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

7 CONCLUSIONES

La caracterización parcial del almidón de las semillas de jinicuil, sugiere que puede tener numerosas aplicaciones como ingrediente en sistemas alimentarios y otras aplicaciones industriales. Este almidón presentó un tamaño de gránulo pequeño menor a 10 μm de forma ovalada, con un pico de viscosidad máxima de 1830 cP obtenido a 87 °C. Este almidón puede ser utilizado para pastas, alimentos para bebés, mermeladas, debido a que presentó un bajo porcentaje de sinéresis. Por su temperatura de gelatinización, también puede destinarse a tratamientos de altas temperaturas, siempre que no se requiera la gelatinización del almidón. Por su contenido de proteína y tamaño de gránulo podría destinarse a microencapsulación de compuestos bioactivos.

Las modificaciones propuestas para tratar el almidón nativo de las semillas de jinicuil permitieron modificar sus características fisicoquímicas, reológicas y estructurales. Más estudios son necesarios para corroborar el efecto sobre las características funcionales del gránulo de almidón de jinicuil.

Las modificaciones del almidón de la semilla de jinicuil permitieron obtener materiales de pared con una potencial aplicación en la encapsulación mediante secado por aspersión, alcanzando escala micrométrica. La mayor eficiencia de encapsulación se alcanzó empleando el almidón nativo como material de pared puesto que ocurre la formación de agregados esféricos debido a su contenido de proteína. El mayor rendimiento de proceso se consigue con el almidón modificado mediante molienda mecánica, debido a que se logra disminuir la viscosidad de la mezcla de alimentación con respecto al resto de los materiales evaluados.

El tamaño de las microcápsulas obtenidas es directamente proporcional al tamaño de partícula y viscosidad del material de pared utilizado. Se confirmó mediante MEB la formación de agregados esféricos cuando se utilizó almidón nativo de jinicuil como material de pared, lo cual impactó directamente en la eficiencia de encapsulación.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

8 PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados del presente proyecto de investigación, se sugiere:

Evaluar el efecto de remover la proteína del almidón de la semilla de jinicuil a diferentes niveles sobre su capacidad de encapsulación y sobre sus propiedades fisicoquímicas, térmicas y reológicas.

Estudiar la modificación física del almidón mediante molienda de alta energía con otros niveles de tiempos de molienda, temperatura y velocidad; y considerar evaluar el efecto del contenido de humedad y de proteína de la muestra sobre su morfología, tamaño de partícula, propiedades fisicoquímicas, térmicas y reológicas.

Evaluar los efectos de la relación material pared-núcleo, temperatura de entrada y de salida, así como porcentaje de sólidos en mezcla de alimentación durante el proceso de encapsulación mediante secado por aspersion utilizando almidón nativo y modificado de semillas de jinicuil.

Caracterizar termodinámicamente de las partículas obtenidas con la finalidad de estudiar la estabilidad de las microcápsulas con respecto al tiempo y condiciones de almacenamiento como humedad y temperatura.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AACCI. (2000). *Approved Methods of Analysis* (10th ed.). St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists International.
- Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K., & Xiaoming, Z. (2012). Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review. *Food Reviews International*, 28(4), 343–374. doi:10.1080/87559129.2011.635390.
- Al-Muhtaseb, A. H., McMinn, W. A. M., & Magee, T. R. A. (2002). Moisture Sorption Isotherm Characteristics of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 80(2), 118–128. doi:10.1205/09603080252938753.
- Alegría, S.C.V. & Rivera, J.R.E. (2011). Estudio gastronómico y nutricional de frutas y hortalizas salvadoreñas. (Tesis de licenciatura), Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado. San Salvador.
- Aguilar-Sandoval, A. (2008). Tratamiento enzimático de la pulpa de plátano (*Musa paradisiaca*) para la obtención de jarabe de glucosa y fibra dietética. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.
- Aparicio-Saguilán, A., Méndez-Montealvo, G., Solorza-Feria, J., & Bello-Pérez, L. A. (2006). Thermal and viscoelastic properties of starch gels from maize varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1078–1086. doi:10.1002/jsfa.246.
- Argun, H., & Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7443–7459. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.116.
- Barra, P.A., Márquez, K., Gil-Castell, O., Mujica, J., Ribes-Greus, A., & Faccini, M. Spray-Drying Performance and Thermal Stability of L-ascorbic Acid Microencapsulated with Sodium Alginate and Gum Arabic. *Molecules*, 24, 2872. doi.org/10.3390/molecules24162872.
- Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Zamudio-Flores, P. B., Mendez-Montealvo, G., & Rodríguez-Ambríz, S. L. (2010). Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1434–1440. doi: 10.1016/j.lwt.2010.04.003.
- Bello-Pérez, L.A., Contreras-Ramos, S.M., Romero-Manilla, R., Solorza-Feria, J., & Jiménez-Aparicio, A. (2002). Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa Paradisiaca* L. (Var. Macho). *Agrociencia* 36(2): 169-180.
- Bello-Pérez, L.A. (2003). Almidón y fibra dietética: Química, Tecnología y Biodisponibilidad. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, 2-4.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- Bernal L & Martínez BE. (2006). Una nueva visión de la degradación del almidón. Revista del centro de investigación Universidad La Salle.7 (25): 77-90.
- Betancur-Ancona, D., Pacheco-Aguirre, J., Castellanos-Ruelas, A., & Chel-Guerrero, L. (2011). Microencapsulation of papain using carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), 67–72. doi: 10.1016/j.ifset.2010.11.002.
- Büchi. (2002). Training Papers Spray Drying. Order code 97758.
- Büchi Labortechnik AG. (2007). The Laboratory Assistant, 3rd ed.
- Bule, MV, Singhal, RS y Kennedy, JF (2010). Microencapsulación de ubiquinona-10 en matrices de carbohidratos para mejorar la estabilidad. *Polímeros de carbohidratos*, 82 (4), 1290–1296. doi: 10.1016 / j. carbpol.2010.07.012.
- Bustillos-Rodríguez, JC., Tirado-Gallegos, JM., Ordóñez-García, M., Zamudio-Flores, PB., Ornelas-Paz, JJ., Acosta-Muñoz, CO., Gallegos-Morales, G., Páramo-Calderón, DE., & Rios-Velasco, C. (2019). *Food Science and Technology*, 39(1): 149-157. doi.org/10.1590/fst.28117.
- Bustos-Garza, C., Yáñez-Fernández, J., & Barragán-Huerta, B. E. (2013). Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. *Food Research International*, 54(1), 641–649. doi: 10.1016/j.foodres.2013.07.06.
- Bravo-Nuñez A. (2001). Interacciones proteína- almidón y su aplicación en Sistema modelo. Universidad de Valladolid.
- Cai, C., Wei, B., Tian, Y., Ma, R., Chen, L., Qiu, L., & Jin, Z. (2019). Structural changes of chemically modified rice starch by one-step reactive extrusion. *Food Chemistry*, 288, 354–360. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.017.
- Carmona-García, R., Sánchez-Rivera, M. M., Méndez-Montealvo, G., Garza-Montoya, B., & Bello-Pérez, L. A. (2009). Effect of the cross-linked reagent type on some morphological, physicochemical and functional characteristics of banana starch (*Musa paradisiaca*). *Carbohydrate Polymers*, 76, 117-122. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.09.029.
- Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B. E., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 242–248. doi: 10.1016/j.lwt.2014.09.042.
- Clemente Granados C; Guzman C, L.E; Acevedo C, D; Díaz M, M; Herrera A, A. (2014). Funcionales Properties Sago Starch (*Maranta Arundinacea*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12 (2), 90-96.
- De Castro, D. S., dos Santos Moreira, I., de Melo Silva, L. M., Lima, J. P., da Silva, W. P., Gomes, J. P., & de Figueirêdo, R. M. F. (2018). Isolation and characterization of starch



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- from pitomba endocarp. Food Research International. doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.032.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361–1394. doi:10.1081/drt-200063478.
- Di Battista, C. A., Constenla, D., Ramírez-Rigo, M. V., & Piña, J. (2015). The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 286, 193–201. doi: 10.1016/j.powtec.2015.08.016.
- Dias, M. I., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food & Function*, 6(4), 1035–1052. doi:10.1039/c4fo01175a.
- Diop, C. I. K., Li, H. L., Chen, P., & Xie, B. J. (2012). Properties of maize starch modified by ball milling in ethanol medium and low field NMR determination of the water molecular mobility in their gels. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 321–331. doi: 10.1016/j.jcs.2012.03.002
- Doherty, S. B., Auty, M. A., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Brodkorb, A. (2012). Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. *Journal of Microencapsulation*, 29(8), 713–728. doi:10.3109/02652048.2011.638994.
- Du, S., Jiang, H., Ai, Y., & Jane, J. (2014). Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches. *Carbohydrate Polymers*, 108, 200–205. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.03.004.
- Chávez-Salazar, A., Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Castellanos-Galeano, F. J., Álvarez-Barreto, C. I., & Pacheco-Vargas, G. (2017). Isolation and partial characterization of starch from banana cultivars grown in Colombia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 240–246. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.024.
- Eliasson, A.-C., & Kim, H. R. (1992). Changes in rheological properties of hydroxypropyl potato starch pastes during freeze-thaw treatments I. A rheological approach for evaluation of freeze-thaw stability. *Journal of Texture Studies*, 23(3), 279-295. doi.org/10.1111/j.1745-4603.1992.tb00526.x.
- Emigdia Flores-Gorosquera, Francisco J. García-Suárez, Emmanuel Flores-Huicochea, María C. Núñez-Santiago, Rosalía A. González-Soto & Luis A. Bello-Pérez. (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón de frutos de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*, ISSN 0001-5504, 55(1) 86-90
- Escobar-Ocampo, M. C., Niños-Cruz, J.A., Ramírez-Marcial, N., & Yépez-Pacheco, C. (2009). Diagnóstico participativo del uso, demanda y abastecimiento de leña en una comunidad zoque del centro de Chiapas, México. *Ra Ximhai*, 5(2), 201-223.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- Espinosa-Solis, V. (2008). Estudios estructurales de almidón de fuentes no convencionales: mango (*Mangifera indica* L.) y plátano (*Musa paradisiaca* L.). Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 138–155. doi: 10.1016/j.tifs.2013.04.001.
- Fan, M., Huang, Q., Zhong, S., Li, X., Xiong, S., Xie, J., ... Zhao, S. (2019). Gel properties of myofibrillar protein as affected by gelatinization and retrogradation behaviors of modified starches with different crosslinking and acetylation degrees. *Food Hydrocolloids*. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.05.045.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523. doi: 10.1016/j.tifs.2010.08.003.
- Flores-Gorosquera Emigdia, Francisco J. García-Suárez, Emmanuel Flores-Huicochea, María C. Núñez-Santiago, Rosalía A. González-Soto y Luis A. Bello-Pérez. (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón de frutos de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*, ISSN 0001-5504. 55(1), 86-90
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., & Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1), 27–35. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.03.047.
- García-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y., Hernández-Martínez, Á. R., & Martínez-Bustos, F. (2016). Encapsulation of Purple Maize Anthocyanins in Phosphorylated Starch by Spray Drying. *Cereal Chemistry Journal*, 93(2), 130–137. doi:10.1094/cchem-04-15-0072-r.
- Gerez, C. L., Font de Valdez, G., Gigante, M. L., & Grosso, C. R. F. (2012). Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 552–556. doi:10.1111/j.1472-765x.2012.03247.x.
- Gałkowska, D., & Juszczak, L. (2019). Effects of amino acids on gelatinization, pasting and rheological properties of modified potato starches. *Food Hydrocolloids*. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.063.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.004.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.004.
- Gibbs, F., Selim Kermasha, Intez Al, B. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213–224. doi:10.1080/096374899101256.
- Gomes da Costa, JM., Hijo, AACT., Silva, EK., Borges, SV., & Marques, GR. (2016). agregando valor a las frutas del cerrado brasileño: encapsulación de aceite de pequi a través del secado por atomización. *Engenharia Na Agricultura - Reveng*, 24(3), 197-204. doi.org/10.13083/reveng.v24i3.625.
- Gonzalez-Soto, R. A., de la Vega, B., García-Suarez, F. J., Agama-Acevedo, E., & Bello-Pérez, L. A. (2011). Preparation of spherical aggregates of taro starch granules. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2064–2069. doi: 10.1016/j.lwt.2011.06.018.
- Gutiérrez, C.J.G., White, O.L., Juan, P.J.I. & Chávez, M.M.C. (2015). Agro ecosistemas de huertos familiares en el subtrópico del altiplano mexicano, una visión sistémica. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 18(3), 237-250.
- He, S., Qin, Y., Walid, E., Li, L., Cui, J., & Ma, Y. (2014). *Effect of ball-milling on the physicochemical properties of maize starch. Biotechnology Reports*, 3, 54–59. doi: 10.1016/j.btre.2014.06.004.
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México, 718-726.
- Hernández, V.E., Campos, A.G.V., Enríquez del V., J.R., Rodríguez-Ortiz, G. & Velasco, V.A.V. (2012). Captura de carbono por *Inga jinicuil* Schltdl en un sistema agroforestal de café bajo sombra. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 28(3), 718-726.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research*, 147(2), 342–347. doi:10.1016/s0008-6215(00)90643-8.
- Hoyos-Leyva, J. D., Chavez-Salazar, A., Castellanos-Galeano, F., Bello-Perez, L. A., & Alvarez-Ramirez, J. (2018). Physical and chemical stability of I -ascorbic acid microencapsulated into taro starch spherical aggregates by spray drying. *Food Hydrocolloids*, 83, 143–152. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.05.002.
- Huang, Z., Lu, J., Li, X., & Tong, Z. (2007). Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 68(1), 128–135. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.07.017.
- John Wiley & Sons. (2015). Introduction to Spray Drying. In *Spray Drying. Techniques for Food Ingredient Encapsulation*, 1-36.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- John Wiley & Sons. (2015). Selection of Wall Material for Encapsulation by Spray Drying. In *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*, 77-100.
- Kaymak-Ertekin, F., & Sultanoğlu, M. (2001). Moisture sorption isotherm characteristics of peppers. *Journal of Food Engineering*, 47(3), 225–231. doi:10.1016/s0260-8774(00)00120-5.
- Koo, S. H., Lee, K. Y., & Lee, H. G. (2010). Effect of cross-linking on the physicochemical and physiological properties of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 619–625. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.02.009.
- Leyva-López, R., Palma-Rodríguez, H. M., López-Torres, A., Capataz-Tafur, J., Bello-Pérez, L. A., & Vargas-Torres, A. (2019). Use of enzymatically modified starch in the microencapsulation of ascorbic acid: microcapsule characterization, release behavior and in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.04.056.
- Li, E., Dhital, S., & Hasjim, J. (2013). Effects of grain milling on starch structures and flour/starch properties. *Starch - Stärke*, 66(1-2), 15–27. doi:10.1002/star.201200224.
- Li, H., Thuy Ho, V. T., Turner, M. S., & Dhital, S. (2016). *Encapsulation of Lactobacillus plantarum in porous maize starch*. *LWT*, 74, 542–549. doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.019.
- Liu, T. Y., Ma, Y., Yu, S. F., Shi, J., & Xue, S. (2011). The effect of ball milling treatment on structure and porosity of maize starch granule. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 586–593. doi: 10.1016/j.ifset.2011.06.009.
- López, O. V., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2010). Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 160–168. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041.
- Lv, Y., Zhang, L., Li, M., He, X., Hao, L., & Dai, Y. (2019). Physicochemical properties and digestibility of potato starch treated by ball milling with tea polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.028.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.265.
- Maniglia, B. C., & Tapia-Blácido, D. R. (2016). Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. *Food Hydrocolloids*, 55, 47–55. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.11.001.
- Martinez, C. S., Ribotta, P. D., Añón, M. C., & León, A. E. (2013). Effect of amaranth flour (*Amaranthus mantegazzianus*) on the technological and sensory quality of bread wheat pasta. *Food Science and Technology International*, 20(2), 127–135. doi:10.1177/1082013213476072.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- Martínez López Valeria. (2018). Modificación de sustratos orgánicos por molienda mecánica para la obtención de biomasa de una cepa productora de biohidrógeno. Universidad del Papaloapan.
- Martínez, M.A., Evangelista, V., Basurto, F., Mendoza, M. & Cruz, R.A. (2007). Flora útil de los cafetales en la Sierra Norte de Puebla, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78(001), 15-40.
- Martínez-Navarrete, N., Camacho Vidal, M. del M., & Martínez Lahuerta, J. J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 2(2), 64-68.
- Masters, K. (1968). SPRAY DRYING—The Unit Operation Today. *Industrial & Engineering Chemistry*, 60(10), 53–63. doi:10.1021/ie50706a008.
- Moraes, J., Alves, F. S., & Franco, C. M. L. (2012). Effect of ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava and Peruvian carrot starches. *Starch - Stärke*, 65(3-4), 200–209. doi:10.1002/star.201200059.
- Moo-Huchin, V. M., Cabrera-Sierra, M. J., Estrada-León, R. J., Ríos-Soberanis, C. R., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., & Pérez-Pacheco, E. (2015). Determination of some physicochemical and rheological characteristics of starch obtained from *Brosimum alicastrum swartz* seeds. *Food Hydrocolloids*, 45, 48–54. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.11.009.
- Montalvo C, A. López- Malo, E. Palou. (2012). Películas comestibles de proteína: Características, propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de alimentos*. 6(2),32-46.
- Moin, A., Ali, T. M., & Hasnain, A. (2019). Thermal, morphological and physicochemical characteristics of succinylated-crosslinked rice starches. *Cereal Chemistry*. doi:10.1002/cche.10191.
- Mottin Demiate, I., Miléo Figueroa, A., Zortéa Guidolin, M.E.B., Rodrigues dos Santos, T.P., Yangcheng, H., Chang, F., & Jay-lin Jane. (2016). Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. *Food Hydrocolloids*, 61, 812-820. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.07.014.
- Muñoz de C., M., Chávez, A.V., Roldán, J.A.A., Ledesma, J.A.S., Mendoza, E.M., Pérez-Gil, F.R., Hernández, S.L.C. & Chaparro, A.G. (1999). Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica. Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”, PAX, Instituto Nacional de Cancerología.
- Murugesan, R., & Orsat, V. (2011). Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients—A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 3–14. doi:10.1007/s11947-011-0638-z.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- OEC - The Observatory of Economic Complexity (2018). Maize (corn), hulled, pearled, sliced or kibbled (HS: 110423) Product Trade, Exporters and Importers. Link: <https://oec.world/en/profile/hs92/maize-corn-hulled-pearled-sliced-or-kibbled>.
- Paredes-López, O., Bello-Pérez, L. A., & López, M. G. (1994). Amylopectin: Structural, gelatinisation and retrogradation studies. *Food Chemistry*, 50(4), 411–417. doi:10.1016/0308-8146(94)90215-1.
- Pérez-Leonard, Heidy; Bueno-García, Gloria; Brizuela-Herrada, María Antonieta; Tortoló-Cabañas, Keyla; Gastón-Peña, Cristina. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47, 14-25.
- Pérez-Masiá, R., López-Nicolás, R., Periago, M. J., Ros, G., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 168, 124–133. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.051.
- Pérez-Pacheco, E., Moo-Huchin, V. M., Estrada-León, R. J., Ortiz-Fernández, A., May-Hernández, L. H., Ríos-Soberanis, C. R., & Betancur-Ancona, D. (2014). Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz Seeds. *Carbohydrate Polymers*, 101, 920–927. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.012.
- Pineda-Gómez, P., Coral, D. F., Arciniegas, M. L., Rorales Rivera, A., & Rodríguez García, M. E. (1794). Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido. *Revista Ingeniería y Ciencia*, ISSN, 9165(6), 11.
- Rangel-Cortez Ana Jared. (2017). Caracterización morfológica, fisicoquímica y estructural del almidón de semillas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*). Universidad del Papaloapan.
- Roa, D. F., Baeza, R. I., & Tolaba, M. P. (2015). Effect of ball milling energy on rheological and thermal properties of amaranth flour. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8389–8394. doi:10.1007/s13197-015-1976-z.
- Sánchez Rivera Jazmín. (2018). Desarrollo de microparticulas a partir de almidón modificado de maíz usado como material de soporte para la encapsulación de compuestos bioactivos. Universidad del Papaloapan.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43(1), 193–202. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.028.
- Sepelevs, I., Stepanova, V. & Galoburda, R. (2018). Encapsulation of Gallic Acid with Acid-Modified Low Dextrose Equivalent Potato Starch Using Spray- and Freeze-Drying Techniques. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(3), 273- 280.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- Serra Horacio Marcelo & Cafaro Tamara Analía. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(4).
- Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U. Y., Makne, S., & Douroumis, D. (2012). Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 8–15. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.038.
- Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 376–387. doi: 10.1016/j.tifs.2008.08.004.
- Silva Faria, W. C., da Conceição, E. C., Moura, W. de M., Barros, W. M. de, Converti, A., & Bragagnolo, N. (2019). Design and evaluation of microencapsulated systems containing extract of whole green coffee fruit rich in phenolic acids. *Food Hydrocolloids*, 105437. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105437.
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 1–22. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.02.006.
- Tan, X., Zhang, B., Chen, L., Li, X., Li, L., & Xie, F. (2015). Effect of planetary ball-milling on multi-scale structures and pasting properties of waxy and high-amylose cornstarches. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 198–207. doi: 10.1016/j.ifset.2015.03.013.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). *Starch—composition, fine structure and architecture*. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151–165. doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001.
- Tharanathan, R. N. (2005). Starch — Value Addition by Modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(5), 371–384. doi:10.1080/10408390590967702.
- Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 91–102. doi: 10.1016/j.tifs.2017.03.009.
- Urzúa Avalenzuela Michell. (2018). Estudio del efecto de la molienda mecánica de alta energía sobre las propiedades del almidón de papa y maíz. Universidad del Papaloapan
- Vamadevan, V., & Bertoft, E. (2014). Structure-function relationships of starch components. *Starch - Stärke*, 67(1-2), 55–68. doi:10.1002/star.201400188.
- Waliszewski, K. N., Aparicio, M. A., Bello, L. A., & Monroy, J. A. (2003). *Changes of banana starch by chemical and physical modification*. *Carbohydrate Polymers*, 52(3), 237–242. doi:10.1016/s0144-8617(02)00270-9.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

- Woo, K., & Seib, P. A. (1997). Cross-linking of wheat starch and hydroxypropylated wheat starch in alkaline slurry with sodium trimetaphosphate. *Carbohydrate Polymers*, 33(4), 263–271. doi:10.1016/s0144-8617(97)00037-4.
- Zanoni, F., Primiterra, M., Angeli, N., & Zoccatelli, G. (2019). Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: effects on stability and color properties. *Food Chemistry*, 125535. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125535.
- Zhang, Z., Zhao, S., & Xiong, S. (2010). Morphology and physicochemical properties of mechanically activated rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 341–348. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.08.016.
- Zhang, Z.-H., Peng, H., Woo, M. W., Zeng, X.-A., Brennan, M., & Brennan, C. S. (2019). Preparation and characterization of whey protein isolate-chlorophyll microcapsules by spray drying: effect of WPI ratios on the physicochemical and antioxidant properties. *Journal of Food Engineering*, 109729. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109729.
- Zhu, F., Mojel, R., & Li, G. (2018). Physicochemical properties of black pepper (*Piper nigrum*) starch. *Carbohydrate Polymers*, 181, 986–993. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.051.
- Zia-ud-Din, Xiong, H., & Fei, P. (2015). Physical and chemical modification of starches: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2691–2705. doi:10.1080/10408398.2015.1087379.
- Ziegler, R. G.; Thompson, B. D.; Casasnovas, J. (1993). Dynamic measurement of starch granule swelling during gelatinization. *Cereal Chemistry* 70(3), 273-281.
- Zortéa-Guidolin, M. E. B., Demiate, I. M., Godoy, R. C. B. de, Scheer, A. de P., Grewell, D., & Jane, J. (2017). Structural and functional characterization of starches from Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*). *Food Hydrocolloids*, 63, 19–26. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.022.