

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
VICEPRESIDENCIA DE INVESTIGACIÓN



Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

Obtención de colorante de quinua (*Chenopodium quinoa Wild*) y su estabilización mediante encapsulamiento por atomización en maltodextrina.

Investigación científica de desarrollo tecnológico

Propiedades funcionales, químicas, bioactivas y nutricionales de tubérculos y granos andinos, frutos tropicales en la industria alimentaria

Informe final de Investigación

Juliaca, Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA

COMISION ORGANIZADORA

Dr. Edwin Catacora Vidangos
Presidente de Comisión Organizadora

Dra. Roxana del Carmen Medina Rojas
Vicepresidenta Académica

Dr. Marcelino Jorge Aranibar Aranibar
Vicepresidente de Investigación

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

M.Sc. Gustavo Luis Vilca Colquehuanca
Director General de Investigación

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Investigadora principal
MSc. Silvana Lisset Aguilar Tuesta

Co investigador
MSc. Wile Mamani Navarro

“A Dios, creador de todo lo bueno de este mundo, porque eres mi roca y mi salvación, te amo Señor, porque en ti todo lo puedo”.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Juliaca, a las autoridades de la Comisión Organizadora, Presidencia Dr. Edwin Catacora Vidangos y Vicepresidencia de Investigación Dr. Marcelino Jorge Aranibar Aranibar, quienes con su respaldo incesante, contribución y confianza permitieron la ejecución de la presente investigación.

Al excelentísimo Dr. Luis Condezo Hoyos, por su asesoramiento y consultoría en todo este trabajo de investigación, quien con su enseñanza, aportes valiosos y prestigio innegable ha logrado consolidar esta investigación elevando el nombre de la Universidad Nacional de Juliaca en el mundo científico.

A todos los profesionales y colegas que participaron en el desarrollo y culminación de la presente investigación, entre ellos el Director de Investigación MSc. Gustavo Luis Vilca Colquehuanca.

A los colegas Clara Espinoza Silva de la Universidad Nacional del Centro del Perú, Facultad de Industrias Alimentarias, Huancayo, Perú. Y Jaime Basilio Atencio de la Universidad Nacional de la Selva, Facultad de Industrias Alimentarias, Tingo María, Perú quienes participaron en esta investigación.

A mi esposo Jaime y a mis hijos Andrea y Josué, por el acompañamiento y apoyo constante para desarrollar este trabajo de investigación.

INDICE

INDICE	5
INDICE DE TABLAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO I: MARCO TEORICO	12
Betalaínas	12
Plantas que contienen betalaínas	16
Actividad antioxidante de las betalaínas	17
Producción de betalaínas	18
Estabilidad de las betalaínas.	18
Encapsulamiento	20
Métodos De Encapsulación	22
Cuantificación de betalaínas	22
CAPITULO II. METODOLOGÍA	24
Semillas de quinua	24
Escarificación de semillas de quinua	24
Propiedades de color y contenido de betalaínas de la cáscara de quinua	24
Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de betalaínas de cáscara de quinua utilizando metodología de superficie de respuesta	25
Extracción de betalaínas de cáscaras de quinoa mediante procedimiento convencional.	29
Estabilidad térmica de betalaínas extraídas de cáscaras de quinua por ultrasonido	30
Extracción de semilla de quinua y betalaínas	32
Microencapsulación de betalaína de quinua mediante secado por pulverización	32
Caracterización del polvo microencapsulado optimizado	34
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Propiedades de color y contenido de betalaínas de cáscara de quinua	37
Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de betalaínas de cáscaras de quinua utilizando metodología de superficie de respuesta	41
Estabilidad térmica de betalaínas extraídas de cáscaras de quinua por ultrasonido	47
Microencapsulación de betacianinas de quinua mediante secado por pulverización	50

Caracterización de betacianinas optimizadas microencapsuladas a partir de extracto de quinua	54
Estabilidad de almacenamiento acelerada de betacianina de quinua microencapsulada optimizada utilizando un sistema Oxitest	57
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	67
ANEXOS	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	27
Valores reales y codificados de variables independientes en el modelo de superficie de respuesta	27
Tabla 2	28
Diseño de Box-Behnken para optimizar la EAU de betalaínas de cáscaras de quinua de colores que contienen betacianinas (M1). Los valores son medias \pm SD (n = 3)	28
Tabla 3	388
Diseño de Box-Behnken para optimizar la extracción asistida por ultrasonido de betalaínas de cáscaras de quinua de colores que contienen betaxantinas (M13). Los valores son medias \pm SD (n = 3)	388
Tabla 4	400
Contenido total de betacianinas, betaxantinas y betalaínas de cáscaras de quinua coloreada de Altiplano peruano. Los valores son medias \pm SD (n = 3).	400
Tabla 5	48
Los parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas extraídas por ultrasonidos basadas en cambios en los valores de color. Los valores son medias \pm SD (n = 3).	48
Tabla 6	61
Diseño compuesto central centrado en la cara para la microencapsulación de betacianina de un extracto de quinua orgánica de color acuoso.	61
Tabla 7	62
Características químicas y físicas de la betacianina de quinua orgánica coloreada microencapsulado por condiciones optimizadas de secado por pulverización.	62

INDICE DE FIGURAS

- Figura. 1. Imagen de semillas y cascaras de quinua coloreada (A). Valores RGB obtenidos de 25 imágenes por histograma análisis de color (B) y gráfico de espacio de color KTL / PCA (C). 311
- Figura. 2. Gráfico de superficie de respuesta (A) y contorno (B) para Extracción Asistida por Ultrasonido de betalaínas de cascaras de quinua de colores que contienen betacianinas (M1). 444
- Figura 3. Gráfico de superficie de respuesta (A) y contorno (B) para Extracción Asistida por Ultrasonido de betalaínas a partir de betaxantinas que contienen cascaras de quinua (M13) 455
- Figura 4. Extracción convencional de betalaínas de cáscaras de quinua 466
- Figura 5. Estabilidad térmica de la betalaínas a partir de cáscaras de quinua coloreados extraídos en agua por ultrasonido 500
- Figura 6 Superficie de respuesta y diagrama de contorno del efecto de las condiciones de secado por aspersion que incluyen temperatura del aire de entrada, tasa de flujo de aire y concentración de maltodextrina (10 DE) en la absorbancia a 540 nm como medida de betacianina microencapsulada (A, B y C) 633
- Figura 7 Imagen de microscopía electrónica de barrido de betacianina de quinua microencapsulada extraída en agua, encapsulada por secado por pulverización (A-B) 644
- Figura 8 Estabilidad de betacianinas microencapsuladas optimizadas de maltodextrina de quinua de color betalaína orgánica en condiciones aceleradas usando un sistema Oxitest (A) 655

RESUMEN

La extracción asistida por ultrasonidos en agua de betalaínas de cáscaras de quinua de colores seleccionados con colores específicos fue optimizado por metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño Box-Benhen y luego la estabilidad térmica de estas betalaínas fue evaluada. Las betacianinas de cáscaras de quinua se extrajeron de forma óptima con una amplitud = 70%, ciclo = 0.6 y tiempo de extracción muy corto = 9.2 s, Q_{final} Def. 2017ue produjo 96.477 mg de betalaínas/100 g de peso fresco de muestra (FW). Para cáscaras de quinua que contienen betaxantinas, una amplitud = 90%; ciclo = 0.7 y extracción se requirió un tiempo = 40 s para la extracción óptima de pigmentos (201,01 mg de betalaínas/100 g FW). El contenido total de saponinas entre 0.69 y 1.14 mg/g FW, y 0.51 y 0.62 mg/g FW se encontraron en el extracto de betacianinas y betaxantinas, respectivamente. Los parámetros cinéticos de estabilidad térmica a 90°C (primera constante de velocidad, $k = 0.068 \text{ min}^{-1}$ y medio tiempo, $t_{1/2} = 10.2 \text{ min}$) para betacianinas extraídas de cáscaras de quinua fueron comparables a los medidos para las betalaínas de remolacha, mientras que la betaxantina extraída de cáscaras de quinua fue más termoestable con una $k = 0.019 \text{ min}^{-1}$ y $t_{1/2} = 37 \text{ min}$. Se utilizó un diseño compuesto central centrado en la cara para evaluar el efecto del aire de entrada temperatura, tasa de flujo de aire y concentración de maltodextrina en betacianina encapsulada extraído en agua de quinua orgánica negra. La microencapsulación óptima se obtuvo a temperatura de secado de 165 ° C, caudal de aire de 47 mm y maltodextrina al 10% p / v, que produjo un buen rendimiento de encapsulación (58.1%) y eficiencia (100%). Se midió como el consumo de oxígeno utilizando un sistema Oxitest. La tasa de consumo de oxígeno de betacianinas fue $-4.37310^{-5} \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$ a 80 ° C y $-6.67 \times 10^{-5} \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$ a 90 ° C y la degradación de betacianina causó la decoloración del color. Las cáscaras de quinua son una buena fuente de betalaínas y la presencia de saponinas en los extractos podría ayudar a producir un ingrediente bifuncional único para la comida y / o industrias farmacéuticas.

Palabras clave:

Betalaínas Cáscaras de quinoa. Extracción asistida por ultrasonido. Metodología de superficie. Estabilidad térmica.

INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es un pseudo-cereal del Región andina en América del Sur que ha sido reconocida como grano nutritivo en todo el mundo (Vega-Gálvez et al., 2010; Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017). Recientemente, se ha demostrado que los cultivares de quinua coloreada son una buena fuente de fenoles, flavonoles y betalaínas, principalmente contenidos en las cáscaras de quinua, (Abderrahim et al., 2015; Escribano et al., 2017; Tang et al., 2015). Las betalaínas están ganando popularidad en la actualidad como pigmentos para su uso como colorantes naturales y/o compuestos bioactivos debido a su antioxidante, anticancerígeno, actividades anti-lipidémicas y antimicrobianas (Gengatharan et al., 2015) y, por lo tanto, las nuevas fuentes vegetales son valiosas e interesantes para las industrias funcionales de alimentos y farmacéutica.

Procedimientos sólidos-líquidos convencionales, como maceración y Soxhlet se usan comúnmente para extraer betalaínas de fuentes vegetales (Celli y Brooks, 2017; Ramli et al., 2014). Por lo tanto, una extracción óptima de betalaínas de *Opuntia jonocostle c.v.* ha sido obtenido usando metanol acuoso como medio (20:80 v/v) durante 10 min a 15°C (Sánchez-González et al., 2013). En otro estudio, la extracción de maceración de betalaínas de *Opuntia ficus-indica* fue óptimo a 42°C durante 115 min (Maran et al., 2013). Los procesos de extracción verde se han desarrollado recientemente como procedimientos alternativos para la extracción de betalaínas que incluyen ultrasonido (Ramli et al., 2014), microondas (Cardoso-Ugarte et al., 2014) o campos eléctricos pulsados (Loginova et al., 2011), su uso puede reducir el tiempo de extracción, el consumo de energía solvente y el post-tratamiento aguas residuales en comparación con los procedimientos convencionales (Chemat et al., 2015; Chemat et al., 2017). La extracción asistida por ultrasonido (EAU) tiene desarrollado para extraer betalaínas de la remolacha (Sivakumar et al., 2009), espinaca malabar (Maran y Priya, 2015), tallos de remolacha roja (Maran y Priya, 2016) y fruta roja del dragón (*Hylocereus polyrhizus*) (Ramli et al., 2014). Sin embargo, las condiciones óptimas para los (EAU) pueden ser depende de la composición de la matriz y la naturaleza química de las betalaínas por lo que las condiciones de extracción deben establecerse para cada fuente de planta.

La EAU podrían ser un proceso ecológico eficiente para extraer betalaínas de colores Cáscara de quinua, pero las condiciones óptimas deben ser evaluadas.

Las betalaínas no se utilizan ampliamente en la industria alimentaria debido a su baja calidad en estabilidad de procesamiento y almacenamiento (Celli y Brooks, 2017; Delgado Vargas et al., 2000). A diferencia de otras fuentes de betalaínas, la quinua coloreada contiene cantidades significativas de amaranthin (121.9-148.6 mg/kg), isoamarantina (108.3-145.5 mg / kg) y dopaxantina (35,9-85,3 mg / kg) (Escribano et al., 2017). Por lo tanto, la estabilidad térmica de las betalaínas extraídas de cáscaras de quinua de colores merece evaluación.

Nuestros objetivos aquí fueron: 1) seleccionar cáscaras de quinua de colores en función de sus perfiles de betalaínas como se muestra por las propiedades de color y absorción espectro, 2) optimiza los EAU de las betalaínas de la cáscara de quinua coloreada seleccionada utilizando una metodología de superficie de respuesta, y 3) evaluar la estabilidad térmica de las betalaínas extraídas por el ultrasonido bajo condiciones de cocción.

CAPÍTULO I: MARCO TEORICO

Betalainas

Las betalaínas son pigmentos naturales pertenecientes al orden de los Caryophyllales y que comprenden a las betacianinas rojo-violeta y a las betaxanthinas amarillas. Las fuentes vegetales más exploradas de betalaínas son la beterraga (*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris*), amaranto (*Amaranthus sp.*), cactus (*Opuntia sp.* and *Hylocereus sp.*) y recientemente la pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) y el olluco (*Ullucus tuberosus*). El interés creciente en la industria-comunidad científica en identificar nuevas fuentes de betalaínas es creciente, debido a su potencial como colorante natural (1) y a sus propiedades farmacológicas como anti-oxidantes, anti-cancerígenos y anti-lipídico (2). Recientemente, se ha identificado que los ecotipos de quinua (*Chenopodium quinoa Wild*) coloreadas producidas en distintas regiones del altiplano peruano son fuentes importantes de betalaínas (3). Estos compuestos están localizadas en la cáscara, un residuo industrial que aguarda ser valorado como ingrediente funcional (4). Diferentes métodos de extracción sostenibles se han desarrollado para revalorizar residuos alimentarios y productos naturales (5), entre ellas la extracción asistida por ultrasonidos que reduce el tiempo y coste del proceso; así como el uso de solventes orgánicos (6). La optimización de la *extracción por ultrasonido* tiene creciente aplicación en la recuperación de compuestos fenólicos a partir de residuos alimentarios (7, 8), pero su uso en la recuperación de betalaínas es escasa (9) y no existe ningún reporte científico de su uso en muestras de quinua coloreadas. (Güneşer, O., 2016.)

Pese a que el uso de las betalaínas como colorante alimentario ha sido aprobado hace más de dos décadas en Europa y en los Estados Unidos de América, su incorporación y empleo en la industria de los alimentos es baja, debido fundamentalmente a los problemas de estabilidad que presentan. Diferentes factores extrínsecos tales como la temperatura, pH, luz, presión de oxígeno y extrínsecos como el grado de glicosilación, la actividad de agua, polifenol oxidasas y metales iónicos pueden afectar la estabilidad de las betalaínas (10). A la fecha no existe ningún estudio relacionado con la estabilidad de las betalaínas extraídas por ultrasonido de la cáscara de quinua coloreada del altiplano peruano, la mayoría de reportes sobre la estabilidad de betalaínas han sido realizados en muestras de beterraga (11) y olluco (12). La información relacionada con la betalaínas

de la cáscara de quinua coloreadas es de interés científico-industrial por la diversidad química subyacente relacionada con los ecotipos. Diferentes estrategias han sido propuestas para mejorar la estabilidad de las betalaínas fuentes convencionales, entre ellas la micro-encapsulación por atomización (13-16), pero no existe referencia científica alguna de la aplicación de la atomización y el impacto de la micro-encapsulación sobre la estabilidad de las betalaínas extraídas de la cáscara de quinua coloreada. (Khan, M.I., 2016).

A raíz de la creciente preocupación por posibles efectos tóxicos de los colorantes sintéticos, se postulan como posibles reemplazantes a los pigmentos de origen natural. En este artículo se resumen los aspectos más importantes de las ventajas y características de las betalaínas, pigmentos hidrosolubles extraídos de la remolacha en primer lugar, proponiendo como fuente alternativa muy interesante a frutos de algunas especies de cactus. La información proviene mayormente de una revisión que se publicó en el Journal of Agriculture and Food Chemistry¹ y algunas otras publicaciones citadas que han aparecido en revistas científicas en las últimas semanas. Son muy pocos los alimentos industrializados que no tienen colorantes. El color es considerado un importante atributo de un alimento, aumentando su atractivo o más aún, vinculándolo con su calidad. (Azeredo, 2009; Khan, 2016).

Al igual que la mayoría de los aditivos alimentarios, los colorantes son en general de origen sintético. Sin embargo, en vista de las dosis relativamente altas que se pueden llegar a consumir de estos ubícuos compuestos – están hasta en lo que uno menos supone como cereales, embutidos, golosinas, lácteos, etc – lo que es mayor aún en niños dado su bajo peso, se ha empezado a poner atención en sus efectos sobre la salud. Como resultado de esto, las autoridades sanitarias han ido retirando la autorización de uso de un gran número de compuestos. Por ejemplo, la FDA ha reducido la lista de colorantes sintéticos autorizados de setecientos a siete² y hace pocos días la EFSA (Agencia de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea) ha recomendado minimizar el agregado de aditivos en general, utilizándolos solamente cuando haya una necesidad real vinculada con la preservación, sabor o estabilidad de los alimentos. En el caso de los colorantes en particular, obligará a las empresas a agregar una advertencia sobre probables problemas de atención en niños en el caso de ingerir 6 de los colorantes sintéticos permitidos en los rótulos de alimentos que los contengan. (Khan, M.I., 2016.)

Sin embargo, con un mercado para los colorantes de un valor estimado en 1000 millones de dólares, de los cuales los naturales ocupan por el momento solo un 25%, las posibilidades de expansión de este sector justifican las inversiones en desarrollo y búsqueda de alternativas de origen natural. (Maran, J.P., Priya, B., 2015)

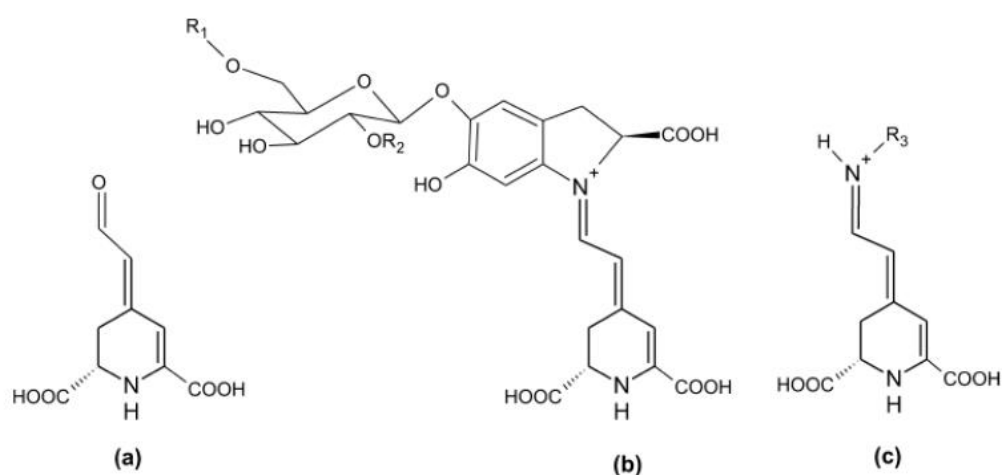
¿Por dónde empezar a buscar colorantes naturales? Lógicamente se buscan entre los diversos “pigmentos” conocidos. Entre los hidrosolubles encontramos las antocianinas, las betalaínas y el ácido carmínico, mientras que los carotenoides y las clorofilas son liposolubles. Hay abundante literatura sobre los carotenoides y las antocianinas, y de hecho, los carotenoides ya se emplean como colorantes. En cuanto a las antocianinas, también se utilizan en los alimentos debido a que están presentes en todo tipo de bayas (arándanos, frambuesas, frutillas, etc) caracterizadas por sus colores rojizos, azulados, pasando por toda la gama de violetas. Tanto en un caso como otro, se ha probado su actividad antioxidante y en el caso de antocianinas muchas otras bioactividades derivadas o no de dicha característica. (Maran, J.P., Priya, B., 2015)

Las betalaínas en cambio, son menos conocidas, probablemente por su relativa escasez natural. Sin embargo, constituyen indudablemente una opción interesante dado su gama de colores, desde el anaranjado amarillento al rojo violáceo. Por otra parte hay evidencia creciente de interesantes actividades biológicas, entre ellas su actividad antioxidante. (Khan, M.I., 2016.)

Las betalaínas están ganando popularidad en la actualidad como pigmentos para su uso como colorantes naturales y / o compuestos bioactivos en las industrias alimentarias y farmacéuticas funcionales debido a sus actividades oxidantes, anticancerígenas, antilipémicas y antimicrobianas (Gengatharan, Dykes, & Choo, 2015). Un pseudo-cereal, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ha sido reconocido como un grano extremadamente nutritivo en todo el mundo (Vega-Galvez, Miranda, Vergara, Uribe, Puente, & Martinez, 2010; Vilcacundo & Hernández-Ledesma, 2017) y ha sido recientemente se descubrió que era una novela y una buena fuente de betalaína (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas, González, y Condezo-Hoyos, 2015; Escribano, Cabanes, Jiménez-Atiénzar, Ibañez-Tremolada, Gómez-Pando, García-Carmona, et al., 2017). Betalains no son ampliamente utilizados en la industria alimentaria debido a su poca estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Kavitha Ravichandran, Saw, Mohdaly, Gabr, Kastell, Riedel, et al.,

2013). Varios factores incluyendo estructura química, temperatura, actividad del agua, luz, oxígeno, contenido de iones de metal y algunos enzimas como la peroxidasa y las glucosidasas han demostrado influir en la betaina estabilidad (Azeredo, 2009; Khan, 2016).

Químicamente las betalaínas son alcaloides derivados de la tirosina que pueden ser de dos tipos: las betacianinas que son de color rojo-violáceo (b) y las betaxantinas (c) anaranjadas amarillentas, ambas con el núcleo fundamental del ácido betalámico (a). (Khan, M.I., 2016.)



El ácido betalámico (a) es el cromóforo común a todos los pigmentos betalámicos; las betacianinas tienen un residuo ciclo-DOPA mientras que las betaxantinas tienen aminoácidos o aminas adicionadas en dicha posición.

Las betacianinas son glicósidos mayormente de la betanidina. Por ejemplo, el pigmento de la remolacha es el betanidin- 5-O - β -glucósido (betanina).

El uso de betalaínas está autorizado por el Codex Alimentarius Commission (2004) y es comercializado en EEUU y la UE con el nombre de “rojo remolacha”. Se consigue como concentrados (producidos por concentración al vacío de jugo de remolacha al 60-65% de sólidos totales) o polvos producidos por liofilización o spray-dry con un 0.3 a 1% de pigmento. Es un colorante relativamente potente, alcanzándose el color deseado con dosis que no exceden los 50 mg/kg calculado como betanina. (Khan, M.I., 2016.)

Plantas que contienen betalaínas.

Hasta este momento no se han detectado antocianinas y betalaínas en una misma planta. Las betalaínas se encuentran en raíces, frutos y flores. Las pocas fuentes conocidas comestibles de *betalaínas* son las *remolachas* (también conocida como *betarraga*) rojas y amarillas: (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), la acelga suiza (*Beta vulgaris* L. ssp. *Cicla*), el amaranto de hoja o *cerealero* (*Amaranthus* sp) y frutos de cactus tales como los del género de *la Opuntia* y del *Hylocereus*. (Khan, M.I., 2016.)

La mayor fuente comercial es la remolacha, de donde se saca un pigmento rojo violáceo que contiene mayoritariamente dos pigmentos hidrosolubles: la betanina (roja), vulgaxantina (amarilla).

También tienen otras betalaínas, la isobetanina, betanidina e isobetanidina además de otra betaxantina: vulgaxantina II. El rendimiento de pigmentos es 0.04–0.21% en el caso de betacianinas y 0.02–0.14% para betaxantinas aunque hay nuevas especies con contenidos mayores. (Khan, M.I., 2016.)

Desventajas de la remolacha: El espectro de colores de las betalaínas está restringido a la betanina. Además, tiene un sabor particular debido a la presencia de la geosmina y algunas pirazinas que se producen aversión particularmente al agregarla a alimentos tales como los lácteos.

Se han empezado a explorar fuentes alternativas entre géneros de la familia Cactaceae, y los frutos de dos de ellos, la pera de cactus, o tuna de diversas especies del género *Opuntia* y las pitayas de los géneros *Cereus*, *Hylocereus* y *Selenicereus*, se cultivan por su valor alimenticio.

El pigmento obtenido de estos frutos es más aceptable organolépticamente que el de las remolachas, ya que no tienen un sabor desagradable sino más bien el hecho de su escaso sabor resultaría en su mayor potencial como colorantes que como alimentos.

La diversidad de colores que presentan es muy interesante, variando del naranja amarillento (*Opuntia* sp) al rojo violáceo (*Hylocereus*). En particular es interesante el color Amarillo ya que son escasos los pigmentos hidrosolubles de este color.

Otra característica muy interesante de estas especies es que sus cultivos se pueden realizar en zonas áridas o semi-áridas debido a sus requisitos mínimos en cuanto a calidad de suelos y agua.

Las pilayas pueden tener entre 0.23 a 0.39% de betacianinas tanto acetiladas como no acetiladas.

Actividad antioxidante de las betalaínas.

Hay abundante literatura sobre las actividades biológicas de estos compuestos, particularmente sobre su actividad antioxidante que se ha vinculado con la actividad anticáncer observada. Si bien la remolacha ha sido incluida entre los 10 vegetales con mayor poder antioxidante, hay también evidencia creciente de una poderosa actividad del fruto de Opuntia. Un ensayo publicado en 2005 reveló que la contribución de las betalaínas a la actividad antioxidante in vitro observado para extractos de Opuntia era mayor que la aportada por el ácido ascórbico. (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016).

En cuanto a las betalaínas aisladas, se ha descrito su actividad como captadores de radicales libres, por ejemplo, la actividad de la betanina – la betacianina de la remolacha – y la indicaxantina para captar el ácido hipocloroso (HClO) el antioxidante más potente producido por neutrófilos humanos.

También se comprobó que los eritrocitos humanos incorporaban betalaínas dietarios, sugiriendo que podrían protegerlas, evitando su hemólisis oxidativa.

La actividad antioxidante la de betanina y de su aglicón la betanidina se manifestó también mediante la inhibición in vitro de la peroxidación lipídica y de la descomposición de heme logrado con concentraciones muy bajas. (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016).

También se ha demostrado que, a pesar de su hidrofiliidad, tanto la betanina como la indicaxantina se pueden asociar al LDL humano in vitro e in vivo aumentando su resistencia a la oxidación.

En cuanto a su actividad anticáncer – que ha sido vinculado a su actividad antioxidante – se ha demostrado la actividad inhibidora de la remolacha y más delante de la betanina en particular, en tumores de piel y pulmón en ratones. Esta actividad también

fue comprobada sobre tumores de ovario, cervicales y vejiga in vitro e in vivo en ratones con cáncer de ovario con un extracto de fruto de cactus (*Opuntia*) a la cual contribuirían las betalaínas como principios activos más importantes.

Producción de betalaínas

Industrialmente, las betalaínas se extraen de las raíces de remolacha a través de diversos procesos de obtención de jugo. La producción biotecnológica no ha tenido éxito ya que no puede competir con el bajo costo de los cultivos con un rendimiento de 0.5g de betanina por kg de raíces de remolacha por ejemplo. (Gandia-Herrero, Cabanes, Escribano, Garcia-Carmona, y Jiménez-Atienzar, 51 2013)

Todos los procesos de extracción industrial se basan en su hidrosolubilidad y en general requieren una inactivación enzimática para evitar hidrólisis de la betanina.

También se promueve la producción de betalaínas a partir de diversos géneros de *Opuntia*, entre ellos la *Opuntia undulata*, *O. ficus-indica*, y la *O. stricta*. Como se explicó antes, estos ofrecen un jugo con escaso sabor, definitivamente mejor que el del jugo de remolacha en cuanto a sus características organolépticas. (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016).

Por otra parte, se ha aplicado el método de la fermentación de los jugos de *Opuntia* con levaduras, tales como la *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* para eliminar el alto contenido de azúcares que se extraen junto con la betanina. El etanol producido en estos procesos se puede utilizar como bioalcohol.

Estabilidad de las betalaínas.

Un requisito evidente de un colorante es su estabilidad a largo plazo, debiendo resistir no sólo los procesos industriales a los cuales están sometidos los alimentos como a las condiciones de pH e interacción con otros componentes de los alimentos en los cuales se encuentra.

Se analiza a continuación la respuesta de las betalaínas a distintas condiciones: pH, temperatura, oxidación, entre otros.

pH.

Uno de los problemas mayores que tienen los colorantes naturales que se encontraron hasta el momento es su baja estabilidad. Por ejemplo, en el caso de pigmentos hidrosolubles, las antocianinas han demostrado ser muy lábiles en medio ácido, hidrolizándose rápidamente.

En el caso de las betalaínas, al ser ionizables en medio ácido, sufren cambios de color tanto a un pH por debajo de 3.5 pero no se hidrolizan por lo cual se pueden utilizar para alimentos ácidos. Su máxima estabilidad está entre pH 5 y 6. (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016).

Luz.

Las betalaínas se degradan en presencia de luz siempre y cuando también estén expuestas a oxígeno. En condiciones anaeróbicas su oxidación es insignificante.

Oxígeno.

Son relativamente oxidables, dando compuestos de color marrón. Esto se puede evitar o disminuir en presencia de antioxidantes tales como vitamina C.

Metales.

En general las betalaínas puras se hidrolizan más fácilmente en presencia de cationes metálicos. Estas reacciones disminuyen considerablemente cuando se encuentran en el jugo, debido seguramente a la capacidad complejante de otros componentes tales como los polifenoles que se encuentran naturalmente en él. (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016).

Temperatura.

Indudablemente es el factor que más afecta la estabilidad de las betalaínas, acelerando las reacciones de hidrólisis que dan como productos el ácido betalámico incoloro y otros productos de color marrón. (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016).

Antioxidantes.

La presencia de antioxidantes estabiliza a las betalaínas, particularmente el ácido ascórbico.

Encapsulamiento

La microencapsulación se ha estudiado como un procedimiento de administración protegida para estabilizar y mejorar la disponibilidad y la accesibilidad de los compuestos bioactivos (Vieira da Silva, Barreira, & Oliveira, 2016). La microencapsulación se ha usado típicamente para producir un secado estable fitoquímicos encapsulados que se utilizan como colorantes alimentarios, aditivos y aromatizantes (Vila, Chaud, y Balcão, 2015). En la industria alimentaria, la microencapsulación se lleva a cabo comúnmente usando tecnología de secado por aspersión, que es económica, flexible, continua y puede alcanzar altos rendimientos de cápsulas de buena calidad (Anandharamakrishnan & Padma Ishwarya, 2015).

Condiciones óptimas de secado por pulverización usando varios agentes encapsulantes (maltodextrina con diferentes grados equivalentes de dextrosa, pectina, goma xantana o mezclas de proteínas y polisacáridos) se han aplicado a microencapsular betalain extraído de convencional fuentes como el cactus (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, y Yáñez-Fernández, 2015; Saénz, Tapia, Chávez, y Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014), amaranthus (Cai & Corke, 2000) y remolacha (Janiszewska, 2014; Pitalua, Jiménez, Vernon- Carter, & Beristain, 2010). Se han usado temperaturas de secado que van desde 133 hasta 180 ° C para microencapsular betalaínas de diferentes fuentes (Gandia-Herrero, Cabanes, Escribano, Garcia-Carmona, y Jiménez-Atienzar, 2013; Pitalua, Jiménez, Vernon-Carter, y Beristain, 2010; Robert, Torres, García, Vergara y Sáenz, 2015; Saénz, Tapia, Chávez, y Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). Buena recuperación y estabilidad del color han sido demostrados para las betalaínas encapsuladas con maltodextrina y goma de xantano de extractos de remolacha (K. Ravichandran, Palaniraj, Saw, Gabr, Ahmed, Knorr, et al., 2014).

De manera similar, la alta estabilidad de las betalaínas purificadas encapsuladas con maltodextrina ha sido demostrado por HPLC, que mostró colores amarillos y púrpuras brillantes de polvos almacenados en -50 20 y 4 ° C (Gandia-Herrero, Cabanes, Escribano, Garcia-Carmona, y Jiménez-Atienzar, 51 2013). Por el contrario, no hay estudios sobre la

microencapsulación de betacianinas extraídas de quinua coloreada que usa tecnología de secado por aspersión en condiciones óptimas. La estabilidad de la betaína microencapsulada se ha estudiado en condiciones aceleradas (Saéñz, Tapia, Chávez, y Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). El efecto del extracto de nopal (pulpa y ultrafiltrado) sobre la estabilidad del almidón modificado-betacianinas y betaxantinas encapsuladas a 60 ° C demostraron que la degradación del pigmento también siguió una cinética de degradación de pseudo primer orden con una tasa constante de 3.3×10^{-3} a 8.2×10^{-3} días⁻¹ (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). Similar, También se siguió la degradación de betacianina en pulpa de cactus y extracto encapsulado en maltodextrina una cinética de pseudo primer orden a una velocidad entre 1.02×10^{-2} y 1.28×10^{-2} días⁻¹ a 60 ° C (Saéñz, Tapia, Chávez, y Robert, 2009). Estos estudios de estabilidad de betaína se han llevado a cabo usando temperatura de almacenamiento y oxígeno como factores de aceleración, controlados por aire constante

En la actualidad existen numerosos ingredientes encapsulados: agentes saborizantes, ácidos, bases, endulzantes artificiales, colorantes, preservantes, agentes leudantes, aromas y nutrientes.

La encapsulación es definida como una tecnología de empaque de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en miniatura. Esto implica el recubrimiento de un ingrediente sensible, ya sea puro o una mezcla, dentro de un material para otorgar protección contra la humedad, calor u otras condiciones extremas, de modo de mejorar su estabilidad y aumentar su vida útil. En el encapsulado, la porción activa es llamada núcleo, fase interna o relleno, y el material encapsulante es llamado cáscara, recubrimiento o material de pared y puede variar tanto en espesor como en el número de capas. La forma de las cápsulas es generalmente esférica, pero se ven fuertemente influenciadas por la estructura del material original no encapsulado. (Escalona I. S, 2004).

La encapsulación de ingredientes en la industria de alimentos permite (Escalona I. s, 2004):

- Estabilizar el material núcleo.
- Controlar la liberación del material núcleo (velocidad y comienzo de la liberación).
- Separar reactivos o componentes incompatibles en una formulación.
- Protección de componentes sensibles del alimento (luz, humedad, calor).

- Aseguramiento contra pérdidas nutricionales.
- Utilización alternativa de ingredientes sensibles.
- Incorporación de mecanismos de liberación inusuales de tiempo dentro de la formulación.
- Enmascarar o preservar sabores y aromas.
- Transformar ingredientes líquidos en sólidos fácilmente manejables.

Métodos De Encapsulación

Existen varios métodos para lograr la encapsulación de ingredientes entre los que se encuentran: secado spray, recubrimiento en suspensión de aire, extrusión, spray cooling y spray chilling, coacervación, complejos de inclusión y polimerización interfacial. La selección del método de encapsulación estará en función de los costos, de las propiedades del material a encapsular, del tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y de los mecanismos de liberación.

El método de secado spray es el método más utilizado en la industria de alimentos, debido a que es un proceso económico, flexible y produce partículas de buena calidad. Este proceso consiste en atomizar el material que se encuentra en estado líquido, ya sea como solución o como dispersión, en forma de finas gotas sobre una corriente de gas calentado. Cuando las pequeñas gotas del líquido toman contacto con el gas a mayor temperatura se produce una rápida evaporación del solvente, formándose una fina película del material de recubrimiento que se encuentra disuelto en él. Las microcápsulas usualmente caen en el rango de varios micrones hasta aproximadamente 200 μm . (Escalona L. S, 2004)

En este proceso, se pueden identificar tres pasos básicos (Escalona L. S, 2004):

- Preparación de la dispersión o emulsión a ser procesada.
- Homogeneización de la dispersión.
- Atomización de la masa dentro de la cámara de secado.

Cuantificación de betalaínas

El contenido de betalaínas se determina como la suma del contenido de betacianinas y betaxantinas empleando el método espectrofotométrico de multi-

componentes adaptado a micro-volúmenes de muestras (Abderrahim et al., 2015). El espectro de absorción de los extractos se midió de 400-700 nm cada 5 nm en un lector de placa automatizado Synergy HT ((Biotek, Rochester, VT, USA). Los picos de betacianinas y betaxantinas del espectro de absorción se deconvolucionan usando un procedimiento de residuales, una línea base lineal, un filtro FTT y un modelo Gauss de PeakFit v.4.12 (Systat Software, Inc., USA). El contenido de betacianinas y betaxantinas se cuantifican usando las absorbancias obtenidos después de la deconvolución y los coeficientes de extinción 60000 and 48000 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente.

CAPITULO II. METODOLOGÍA

2.1. Semillas de quinua

Semillas de cinco granos de quinua de diferentes colores (*Chenopodium quinoa Willd.*) fueron seleccionados y cosechados en marzo de 2016 en la región Puno del altiplano peruano. La quinua coloreada fue seleccionada sobre la base de su máximo diversidad tonal para reflejar diferentes perfiles de betalaínas (Abderrahim et al., 2015). Los nombres comunes de las muestras de quinua seleccionadas fueron: M1 = Pasankalla rojo, M2 = Pasankalla rosado, M5 = Chullpi rojo, M7 = Capachica rosa y M13 = Pasankalla rojo brillante (Fig. 1A).

Se utilizó agua de calidad ultrapura MilliQ (<18,2 mΩ) para la extracción de betalaínas.

2.2. Escarificación de semillas de quinua

Un subproducto del procesamiento de la quinua, son las cáscaras de las semillas que son ricos en betalaínas y saponinas. Las saponinas son compuestos amargos que se eliminan de la semilla por escarificación. En el presente estudio, 10 g de las semillas de quinua se escarificaron mediante rascado manual en malla n° 35 por 10 minutos a temperatura ambiente. La cantidad de cáscara recolectadas varió desde 0,33 a 0,40 g (3,3-4,0% p/p), que se empacaron inmediatamente en envases sellados y almacenados a -20 ° C hasta el análisis.

2.3. Propiedades de color y contenido de betalaínas de la cáscara de quinua

2.3.1. Propiedades del color

Las imágenes de las semillas de quinua y cáscara se adquirieron simultáneamente con un Escáner HP PSC 1510 (HP, NY, EE. UU.) Con una resolución máxima dentro de una caja negra adaptada para evitar exponer las muestras a la luz externa y mantener la mejor calidad de imagen. Histogramas rojos (R), verdes (G) y azules (B) se obtuvieron mediante análisis de imagen utilizando el histograma de color herramienta en el software Fiji ImageJ (Institutos Nacionales de Salud (NIH), Maryland, EE. UU.). Un espacio de color KLT / PCA y modo de visualización Median Cut del plugin Fiji ImageJ Color Inspector 3D también se usaron. El espectro de absorción se midió como en la Sección 2.3.1 para clasificar los colores de las muestras de quinua.

2.3.2. Cuantificación de betalaínas

Se extrajeron cincuenta microgramos de muestras de quinua con 500 μ l de agua bajo agitación a velocidad máxima durante 30 minutos a temperatura ambiente. El extracto acuoso se centrifugó a 12000 \times g durante 5 minutos a 4 ° C. El sobrenadante (100 μ l) se transfirió a una placa de 96 pocillos y el espectro de absorción se adquirió entre 400 y 700 nm cada 5 nm en un lector de microplacas multimodo Synergy HT (Biotek, Rochester, VT, ESTADOS UNIDOS).

El contenido total de betalaínas se evaluó como la suma de betacianinas y betaxantinas mediante el procedimiento espectrofotométrico del lector de microplacas (Abderrahim et al., 2015). Se utilizó un procedimiento residual para la separación máxima y análisis (betacianinas y betaxantinas) empleando un línea de base lineal, filtro Savitsky-Golay para suavizado y pico de Gauss modelo del software PeakFit v.4.12 (Systat Software, Inc., EE. UU.). Betacianinas (MW = 550,46 g / mol) y betaxantinas (MW = 538,35 g /mol) se cuantificaron a partir de su absorbancia estimada después de la separación máxima utilizando coeficientes de extinción molar de 60,000 y 48,000 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente. La longitud de la ruta fue calculada del volumen de la muestra y del diámetro del pozo en la placa de 96 pocillos.

2.4. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de betalaínas de cáscara de quinua utilizando metodología de superficie de respuesta

2.4.1. Equipo de ultrasonido

Un dispositivo de laboratorio ultrasónico compacto UP 100H (Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Alemania) de 100W y 30 kHz fue utilizado para extraer betalaínas de dos muestras seleccionadas de cáscara de quinua. Un MS Sonotrodo estándar de 0,5 (diámetro de punta de 0,5 mm, amplitud máxima de 140 μ m) y densidad de potencia acústica de 125 W / cm²) para llevar fuera de la extracción de betalaínas. Este equipo puede ajustar la salida potencia regulando el porcentaje de amplitud (20-100%). En adición, el UP100H también puede operar en modo de control de pulso para temperatura muestras sensibles Un control de pulso establecido en 1 significa que el ultrasonido el equipo es operado continuamente y un valor de 0.6 indica el la potencia se descarga durante 0,6 s con una pausa de 0,4 s.

2.4.2. Diseño experimental

La extracción asistida por ultrasonido de betalaínas se llevó a cabo en tubos en una proporción de 1:100 de cáscara de quinua al agua, que fueron seleccionados por imagen análisis. La extracción de ultrasonido de cáscaras de quinua seleccionadas fue optimizado por una metodología de superficie de respuesta (RSM) usando un Box-Diseño Behnken (número de puntos centrales = 3). Amplitud (X1), ciclo (X2) y el tiempo de extracción (X3) se incluyeron como variables independientes (Tabla 1) y el contenido total de betalaínas (Y) como variable dependiente. Los siguientes valores de variables independientes fueron empleados: para la muestra M1, X1 de 60 a 90; X2 de 0.2 a 0.6 y X3 de 2 a 20 segundos y, para la muestra M13, X1 de 50 a 90; X2 de 0.6 a 1.0 y X3 de 10 a 40 s (Tabla 1). La amplitud y el ciclo o pulso de ultrasonido, así como el tiempo de extracción se evaluaron para optimizar la extracción de betalaínas de cáscaras de quinua como se hizo en similares previas estudios para los EAU de antioxidantes (Pan et al., 2012, Hammi et al., 2015). RSM de una fase utilizando el diseño Box-Behnken con 3 puntos centrales se realizó para los EAU de betalaínas de cáscaras de quinua por niveles para las siguientes variables independientes: X1 = 40-100%, X2 = 0.2-1 y X3 = 1-5 min. Estos experimentos RSM, determinaron diferentes niveles para variables independientes en las muestras de quinua M1 y M13. La extracción tiempo de betalaínas de las muestras de quinua M1 y M13 fue reducido drásticamente para encontrar la región óptima (máximo contenido de betalaínas). La diferencia en estos niveles se puede explicar por la naturaleza química estas muestras de quinua seleccionadas que contienen betalaínas químicamente diferente. Un estudio previo demostró que las betacianinas requieren menos tiempo de extracción (90-120 s) que la betaxantina (140-150 s) en una extracción usando tecnología de microondas (Cardoso-Ugarte et al., 2014).

Se utilizó un polinomio de segundo orden para el modelado matemático de la relación entre las variables dependientes e independientes.

(Ec. (1)). El contenido total de betalaínas en condiciones óptimas, estimado utilizando polinomios de segundo orden, fue validado experimentalmente. Los

experimentos de RSM se diseñaron y analizaron utilizando el software Minitab 17 (Minitab Inc., EE. UU.).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

Donde Y era la respuesta o variable dependiente, X1, X2 y X3 eran independientes variables, mientras que β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son la intersección, lineal, coeficientes cuadráticos e interacciones, respectivamente. El residuo se denota como ε .

Tabla 1

Valores reales y codificados de variables independientes en el modelo de superficie de respuesta.

Independent variables		Quinoa hulls containing betacyanins (M ₁)		Quinoa hulls containing betaxanthins (M ₁₃)	
		Real values	Coded Values	Real values	Coded Values
Amplitude (%) ^a	X ₁	60	-1	50	-1
		75	0	70	0
		90	+1	90	+1
Cycle	X ₂	0.2	-1	0.6	-1
		0.4	0	0.8	0
		0.6	+1	0.1	+1
Extraction time (s)	X ₃	2	-1	10	-1
		11	0	25	0
		20	+1	40	+1

a Los valores reales son porcentajes de la amplitud máxima. Un sonotrodo estándar MS 0.5 (Diámetro de la punta de 0,5 mm, amplitud máxima de 140 μm y potencia acústica de 125 W / cm² densidad) se empleó para llevar a cabo la extracción de betalaínas.

Tabla 2

Diseño de Box-Behnken para optimizar los EAU de betalaínas de cáscaras de quinua de colores que contienen betacianinas (M1). Los valores son medias \pm SD (n = 3).

Run	Coded independent variables			Total Betalains ¹ (mg/ 100 g FW)	Total Saponins ² (mg/ gFW)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	0	+1	+1	75.8 \pm 1.0	0.94 \pm 0.08
2	0	+1	-1	92.3 \pm 2.2	0.82 \pm 0.06
3	0	-1	+1	67.5 \pm 1.5	0.69 \pm 0.02
4	-1	+1	0	94.0 \pm 2.0	0.89 \pm 0.00
5	+1	0	-1	83.3 \pm 1.4	0.71 \pm 0.00
6	0	0	0	86.2 \pm 1.5	1.14 \pm 0.06
7	-1	0	-1	64.5 \pm 1.0	0.83 \pm 0.00
8	+1	0	+1	53.2 \pm 0.7	1.11 \pm 0.02
9	+1	+1	0	79.7 \pm 3.4	0.96 \pm 0.05
10	0	0	0	86.2 \pm 1.5	0.69 \pm 0.02
11	0	0	0	87.4 \pm 0.4	0.93 \pm 0.07
12	0	-1	-1	79.2 \pm 1.4	1.07 \pm 0.04
13	+1	-1	0	83.2 \pm 3.3	0.90 \pm 0.05
14	-1	-1	0	72.6 \pm 1.1	1.10 \pm 0.03
15	-1	0	+1	72.2 \pm 4.5	1.06 \pm 0.10

1 El contenido total de betalaínas se evaluó como la suma de betacianinas y betaxantinas por un procedimiento espectrofotométrico de lector de microplacas. Se utilizó un procedimiento residual para separación máxima y análisis (betacianinas y betaxantinas) usando una línea base lineal, Filtro Savitsky-Golay para suavizado y modelo de pico de Gauss.

2 El contenido total de saponina se calculó a partir de la siguiente curva estándar adaptada: mg saponina / g FW = [(0,432 \times (altura de la espuma) \times 0,008) / (g FW)] / 10 (Koziol, 1991). El 10 factor fue relacionado con la concentración de la solución preparada, en el método original es de 100 mg / mL y en las muestras preparadas aquí para extracción asistida por ultrasonido, fue 10 mg / ml.

2.4.3. Contenido de saponinas en los extractos optimizados por ultrasonido.

Un método micro y rápido afrosimétrico adaptado de Koziol (1991) se usó para medir el contenido de saponinas en el ultrasonido optimizado extractos. Brevemente, se transfirieron 100 μ l de extracto a pozos en un Placa de 96 pocillos y mezclada con un movimiento de pipeta hacia arriba y hacia abajo durante 10 s en temperatura ambiente.

Inmediatamente después, el pozo fue fotografiado usando un teléfono inteligente P8 Lite (Huawei Technologies Co. Ltd., Madrid, España).

La altura de la espuma producida por este método adaptado se midió en imagen adquirida utilizando el software Fiji ImageJ y la escala establecida de diámetro del pozo conocido. En el método original, se calculó la altura de la espuma usando Eq. (2)

$$h_{\text{original_metodo}} = h_{\text{adaptado_metodo}} \times \left(\frac{D_{\text{well}}}{D_{\text{original_tube}}} \right)^2 \quad (2)$$

Donde: D y h son, respectivamente, diámetro y altura en mm, respectivamente.

D bien = 8 mm y D tubo original = 16 mm.

El contenido total de saponinas se calculó a partir de la siguiente curva estándar adaptada: mg de saponina/g FW = [(0,432 × (altura de la espuma) × 0,008) / (g FW)] / 10 (Koziol, 1991). El factor 10 se relacionó con la concentración de la solución preparada, en el método original es de 100 mg / ml y en las muestras preparadas aquí para la extracción asistida por ultrasonido, fue de 10 mg / ml.

2.5. Extracción de betalaínas de cáscaras de quinoa mediante procedimiento convencional.

Las betalaínas se extrajeron de cáscaras de quinoa coloreadas usando un convencional procedimiento (Abderrahim et al., 2015). Cinco miligramos de cáscara y 500 µl de agua se pusieron en un criogénico de fondo redondo de 1,8 ml vial (Nunc® CryoTubes®, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y mixto bajo constante agitación a una velocidad máxima en una coctelera "movil rod" (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España) durante 10, 15, 25 y 40 min en la habitación temperatura. Los sobrenadantes que contienen betalaínas fueron recolectados de los extractos por centrifugación a 2100 × g durante 10 minutos (4 ° C). El total contenido de betalaínas se evaluó como la suma de betacianinas y betaxaninas mediante el procedimiento espectrofotométrico del lector de microplacas (Abderrahim et al., 2015) (ver Sección 2.3.1).

2.6. Estabilidad térmica de betalaínas extraídas de cáscaras de quinua por ultrasonido

La estabilidad térmica de las betalaínas extraídas de las cáscaras quinua seleccionada se evaluaron bajo condiciones de cocción normales usando un robot cocina Thermomix TM 31 (Vorwerk, Madrid, España). Cinco mililitros de extractos de betalaína de ambas muestras de cascara de quinua se pusieron en bolsas de plástico transparentes, selladas y calentadas a 90 ° C durante 70 min al mínimo de velocidad de agitación y muestreado cada 10 minutos para el análisis de imágenes. Las muestras se calentaron en 1,5 l de agua, que se calentó previamente para alcanzar la temperatura de cocción (90 ° C). Se usó un extracto acuoso de remolacha preparado a partir de remolacha cocida a vapor comercial (El Campo, Madrid, España) como fuente de betalaínas para comparación.

El análisis de imagen se utilizó para medir el contenido de betalaínas como la degradación del color térmico (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016) fue medido por análisis de imagen. Las imágenes de los extractos contenidos en bolsas plásticas transparentes fueron adquiridas con un iPad Air 2 (Apple, Madrid, España) bajo luz natural. De cada imagen, la región de interés (ROI) se extrajo utilizando el software ImageJ y se exportó como archivos TIFF.

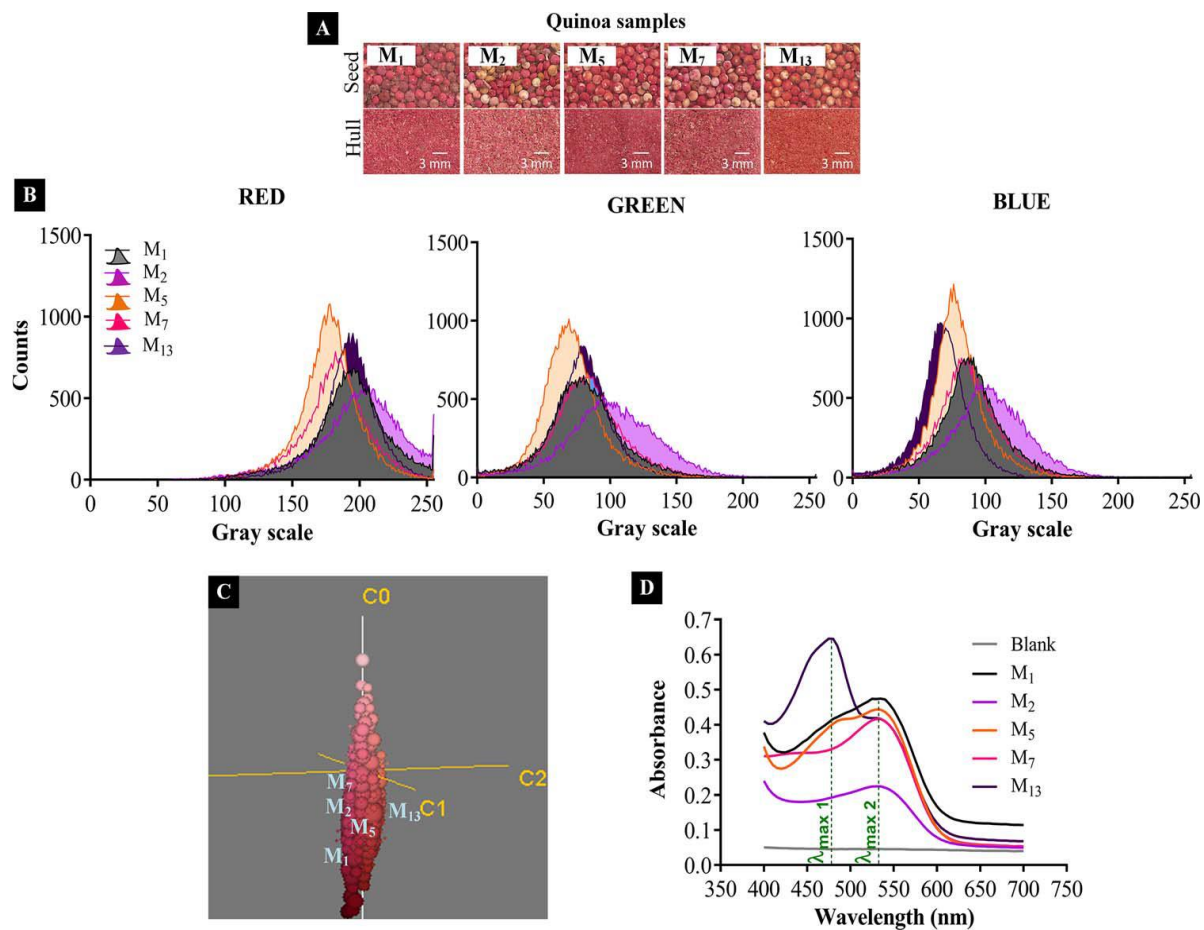


Fig. 1. Imagen de semillas y cascos de quinua coloreada (A). Valores RGB obtenidos de 25 imágenes por histograma análisis de color (B) y gráfico de espacio de color KTL / PCA (C). Espectro de absorción de un extracto acuoso (blanco = agua) medido en un lector de microplacas de 400 a 700 nm (media de mediciones triplicadas). Los nombres comunes de las muestras son: M1 = Pasankalla rojo, M2 = Pasankalla rosado, M5 = Red Chullpi, M7 = Rosa Capachica y M13 = Pasankalla rojo brillante. (Para la interpretación de las referencias al color en esta leyenda de la figura, el lector se refiere a la versión web de este artículo).

Los archivos TIFF se analizaron con la aplicación gratuita Android ON color Medida para calcular los valores Rojo (R), Verde (G), Azul (B) y HSV (Suplementario Figura 1). De los valores de color anteriores, distancias euclidianas absolutas (ED) se utilizaron como una medida de la degradación del color (Abderrahim et al., 2016; Güneşer, 2016) y calculado a partir de la ecuación. (3)

$$ED = \sqrt{(R_b - R_s)^2 + (G_b - G_s)^2 + (B_b - B_s)^2 + (H_b - H_s)^2 + (S_b - S_s)^2 + (V_b - V_s)^2} \quad (3)$$

Donde R_s, G_s, B_s, H_s, S_s y V_s = Media de R, G, B, H, S y V, respectivamente calculado a partir de bolsas que contienen muestras y R_b, G_b, B_b, H_b, S_b y V_b = Media de R, G, B, H, S y V, respectivamente, calculadas a partir de bolsas que contienen agua.

Los valores ED se relativizaron con ED en el tiempo = 0 min igual a 100% y la distancia euclidiana relativa (rED) frente al tiempo de calentamiento se ajustó al modelo cinético de primer orden (Ecuación (4)) para estimar los parámetros cinéticos usando un método no lineal análisis de regresión (Fernández - López et al., 2013; Güneşer, 2016). Los valores ED se relativizaron con ED en el tiempo = 0 min igual a 100%

$$rED = (rED_0 - Plateau)e^{(-kt)} + Plateau \quad (4)$$

rED y rEDo son relativos EDs a diferentes tiempos de calentamiento y t es calefacción tiempo (min) Plateau es un valor de rED mínimo en la región de la meseta y k es la constante de velocidad de reacción de primer orden (min⁻¹).

2.7. Extracción de semilla de quinua y betalaínas

La quinua negra orgánica (*Chenopodium quinoa Willd.*) fue proporcionada por Coopain-Cabana (<http://www.coopaincabana.com/index.php/products>), una compañía de alimentos integrales orgánicos de la región peruana del Altiplano (Cabana, Puno, Perú). Sesenta y siete gramos de quinua fueron sometido a extracciones sucesivas con 1500 y 1000 ml de agua MilliQ de grado ultrapuro (<18,2 mΩ) en un agitador magnético (Velp, Italia) dos veces a 1500 rpm y temperatura ambiente durante 1h cada vez. El extracto crudo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y almacenado a -20 ° C hasta su uso.

2.8. Microencapsulación de betalaína de quinua mediante secado por pulverización

2.8.1. Proceso de secado por pulverización

Los extractos de betalaínas se alimentaron a un secador por pulverización Buchi B-290 (Buchi, Suiza) a una velocidad de alimentación de 6,7 ml min⁻¹ (20% de la capacidad total del secador por pulverización) y se secaron por pulverización a una entrada de aire

temperatura (IAT) entre 140 ° C y 180 ° C con un índice de flujo de aire (AFR) entre 40 y 60 mm de altura medido por rotámetro. Equivalente de dextrosa de maltodextrina (DE) 10 (Sigma-Aldrich, España) como agente de encapsulación a niveles del 10 al 30% p / p. los el proceso de secado por pulverización se caracterizó midiendo el rendimiento de secado por pulverización determinado como % De rendimiento = $(W_p / W_f) \times 100$, donde W_p es el peso (g) del producto recolectado, y W_f es el peso (g) de la masa no disolvente en la alimentación (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, y Yáñez-Fernández, 2015).

2.8.2. Diseño experimental

El proceso de secado por pulverización se realizó utilizando un diseño compuesto central centrado en la cara ($\alpha = 1$) con 20 carreras totales y 6 puntos centrales para determinar el error experimental. La concentración de AFR y maltodextrina (MD) se utilizaron como variables independientes (Tabla 6). Se usó la absorbancia a 540 nm de microencapsulados como una variable de respuesta que está relacionada con la betacianina microencapsulada. Los datos experimentales se ajustaron a un segundo orden polinomio [Eq. (1)] utilizando un software de prueba Design Expert 7.0 (Stat-Ease, Inc., MN, EE. UU.).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

Donde: β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de intersección, lineal, cuadrático e interacción, respectivamente. El residuo se denota como ε .

Además, el contenido de humedad, la medición del color y la densidad aparente también se midieron en cada de los microencapsulados de betacianina como se describe a continuación

2.8.3. Contenido de betacianina microencapsulada

2.8.3.1. Betacianina superficial

Diez microgramos de betacianina microencapsulada se trataron con 500 μ L de una mezcla de etanol y metanol (1: 1 v / v) y se agitó en un vórtice a temperatura ambiente durante 1 minuto antes centrifugación a 13, 143 g x 5 min (Saézn, Tapia, Chávez y Robert, 2009). La absorbancia se midieron 540 nm en el sobrenadante mediante un lector de microplacas y se usaron para calcular la superficie de contenido de betacianina usando un peso molecular = 550.46 y un coeficiente de extinción molar = 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas, Gonzalez, y Condezo-Hoyos, 2015).betacianina Sesenta

microgramos de microcápsulas fueron tratados con 3 ml de agua, agitados en una coctelera en temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se centrifugó a 13,143 g x 5 min (Saénz, Tapia, Chávez, y Robert, 2009). La absorbancia total a 540 nm se midió en el sobrenadante; total.

Se calculó el contenido de betacianina de los microencapsulados (ecuación 2) utilizando un peso molecular = 550.46 y coeficiente de extinción molar = 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas, Gonzalez, y Condezo-Hoyos, 2015).

2.9. Caracterización del polvo microencapsulado optimizado

2.9.1.. Actividad de agua y contenido de humedad

Se usaron 200 microgramos, por triplicado, del producto microencapsulado optimizado para medir la actividad del agua a 25 ° C en un analizador de sorción de vapor AquaLab (Aqualab, WA, ESTADOS UNIDOS). El contenido de humedad de la betacianina microencapsulada fue gravimétricamente determinado por secado de 0,5 g de micropartículas, por triplicado, a 70 ° C hasta que el peso constante fue logrado (AOAC, 1996).

2.9.2 Cuantificación de Betacianina y Saponina

La betacianina se extrajo de microencapsulas optimizadas como se describió anteriormente y evaluado como betacianinas totales utilizando un peso molecular = 550.46 y un coeficiente de extinción molar de 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas, González, & Condezo-Hoyos, 2015). La saponina se midió mediante un procedimiento afrosimétrico 170 adaptado rápidamente (Koziol, 1991). Brevemente, se colocaron cien microgramos de microencapsulados en un tubo de ensayo de rosca (160 mm de longitud y 10,9 mm de diámetro) y se agitó vigorosamente en 1 ml de agua. La altura de la espuma se midió 5-10 s después de la sacudida.

2.9.3. Medición del color.

Se colocaron diez gramos del polvo en un colorímetro de plato y se midieron los parámetros L, a, b, h y C color del espacio CIELab por triplicado usando un colorímetro (Konica Minolta Colorimeter CR-400, Japón).

2.9.4. Densidad aparente y disolución

Se midió la densidad aparente de microencapsulado pesando 0,6 g de muestra y colocándolo en un cilindro graduado de 10 ml. Se produjo una vibración constante en un vibrador durante 3 minutos y luego se registró el volumen y se usó para calcular la densidad aparente como g / ml (Cai y Corke, 2000). La disolución se llevó a cabo añadiendo 0,4 g de microencapsulados a 10 ml de agua destilada y la mezcla se agitó en un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml con un agitador magnético a 892 rpm y una barra de agitación que medía 2 mm x 7 mm. Se midió el tiempo requerido para la disolución completa de microencapsulados (Negrão-Murakami, Nunes, Pinto, Murakami, Amante, Petrus, et al., 2017).

2.9.5. Tamaño de partícula y morfología

El tamaño de partícula y la estructura de las microcápsulas optimizadas secadas por pulverización se evaluaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30 S-FEG, SEMTechSolutions, EE. UU.) operado a 20 kV.

Las muestras se recubrieron a través de un proceso de bombardeo iónico con una capa de cromo de 15 nm de espesor (Q150T-S, Quorum Technologies, Reino Unido). El diámetro de trescientos cincuenta partículas fue analizado manualmente por el software ImageJ (<https://imagej.net/Downloads>).

2.9.6. Estabilidad de almacenamiento acelerada

Se usó un reactor de prueba de oxidación Oxitest (Velp Scientifica, Italia) para evaluar el almacenamiento de la estabilidad de microencapsulados optimizadas bajo los efectos de dos factores de aceleración, la temperatura ajustada a 80 ° y 90 ° C y la presión de oxígeno establecida en 6 barras. Se colocaron dos gramos de microencapsulados en las cámaras del reactor y se adquirió presión de oxígeno durante 72 h cada 1 minuto usando OxiSoft Software (Velp Scientifica, Italia). En las condiciones de almacenamiento iniciales aceleradas y finales, se adquirieron imágenes de microencapsulados usando una cámara de teléfono inteligente ; Los valores rojo (R), verde (G), azul (B) y HSV se midieron con la aplicación gratuita Android "On Color Measure" (<http://www.apkthing.com/tools/7570-on-color-measure.html>). La distancia euclídea entre dos puntos (microencapsulados, mi espacio en blanco, b) se usó para calcular las diferencias de color, una medida de la

degradación de betacianinas (Ecuación 3) (M. Abderrahim, M. Arribas, y Condezo-Hoyos, 2016) Donde, R_m , G_m , B_m , H_m , S_m y V_m = Promedio R , G , B , H , S y V , calculados respectivamente a partir de microencapsulados antes y después de ser sometidos a una condición de almacenamiento acelerado. R_b , G_b , B_b , H_b , S_b y V_b = Media de R , G , B , H , S y V , calculados respectivamente a partir del blanco, una imagen de color blanco.

2.9.7. Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de correlación para determinar la asociación entre la absorbancia a 540 nm de, una solución acuosa de microencapsulados y los parámetros CIE Lab. El diseño y el análisis compuestos centrados en la cara central se usaron para optimizar el proceso de secado por aspersión. El análisis de regresión se llevó a cabo para estimar la tasa de consumo de oxígeno en la prueba de almacenamiento acelerado y la distribución del tamaño de partícula. El análisis estadístico se realizó en GrapPad Prism (GraphPad Prism 6.1, San Diego, CA, EE. UU.), Design Expert 10 (Stat-Ease, Inc., MN, EE. UU.) y EasyFit (Math Wave Technology, EE. UU.).

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Propiedades de color y contenido de betalaínas de cáscara de quinua

La mayoría de los pigmentos se encuentran en la cáscara de quinua, que son eliminado mecánicamente por escarificación para reducir la amargura de las semillas. Este sabor amargo se ha asociado con el contenido de triterpeno saponina que tiene actividad anticancerígena in vitro (Kuljanabhagavad et al., 2008). La cáscara de quinua roja que es un subproducto que es una fuente de compuestos bioactivos que deberían evaluarse.

Las propiedades de color de las cáscaras de quinua, que van desde el rojo al rojo-naranja (Fig. 1A), se midieron mediante análisis de imagen para seleccionar la diversidad química máxima basada en sus perfiles de betalaínas, que incluía betacianinas y betaxantinas o una mezcla. Un anterior estudio realizado por nuestro grupo de investigación demostró que diferentes tonos de rojo Las semillas de quinua contienen diferentes proporciones de betacianinas / betaxantinas (Abderrahim et al., 2015). Estudiamos si las cáscaras de quinua, contienen betacianinas que predominan y que se pueden extraer por EAU en condiciones similares a las de las muestras con un contenido de betaxantina significativo. Las propiedades de color de las cáscaras de quinua para (H °), Saturación (S) y Luminosidad (L) se calcularon a partir de los valores medios de RGB (Fig. 1B). Los siguientes valores de color HSL se encontraron en las muestras: -5 (M1), 1 (M2), -5 (M5), 4 (M7) y 5 (M13) para H °; 50.2 (M1), 46.6 (M2), 44.1 (M5), 43.4 (M7) y 53.7 (M13) para S%; y 53.5 (M1), 56.7 (M2), 48.1 (M5), 52.2 (M7) y 51.8 (M13) para L%. Al igual que los encontrados previamente en semillas de quinua roja (Abderrahim et al., 2015), las cáscaras de quinua mostraron valores H que van desde + 5 ° a -5 ° y valores L entre 48.1 y 56.7%. El grado de Saturación (43.4% <S <53.7%) reflejó que el principal el color en las muestras del cáscara no era tan puro como se había encontrado previamente en semillas de quinua roja (Abderrahim et al., 2015). En un reciente estudio con seis semillas de quinua roja, el color CIELab se midió mediante espectrofotometría (Escribano et al., 2017). Los valores de L variaron de 45.30 a 48.28, a * de 17.20 a 23.99 y b * de 5.11 a 11.24 (Escribano et al., 2017). Cuando se convirtieron los valores de CIELab para las semillas de quinua roja en el espacio de color HSL, se encontraron los siguientes valores H = -4.4-1.9 °, S = 17.6-24.4% y L = 45.7-49.8%. El H y L los valores fueron similares a los encontrados en los cascotes de quinua roja, pero los valores S eran más bajos, lo que podría explicarse por la pérdida parcial de la cáscara de las muestras de semilla de quinua. La presencia de semilla de

quinua sin cáscara permitió aumentar la heterogeneidad del color medida por espectrofotometría con un accesorio de esfera integrada acoplada.

Tabla 3

Diseño de Box-Behnken para optimizar la Extracción Asistida por Ultrasonido de betalaínas de cáscaras de quinua de colores que contienen betaxantinas (M13). Los valores son medias \pm SD (n = 3).

Run	Coded independent variables			Total Betalains ¹ (mg/ 100 g FW)	Total saponins ² (mg/ g FW)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	0	0	0	194.9 \pm 3.4	0.61 \pm 0.03
2	0	+1	-1	180.7 \pm 2.1	0.53 \pm 0.01
3	+1	-1	+1	193.9 \pm 8.7	0.49 \pm 0.02
4	0	-1	+1	184.3 \pm 0.6	0.57 \pm 0.02
5	0	-1	-1	173.8 \pm 4.5	0.56 \pm 0.01
6	+1	0	+1	198.8 \pm 5.9	0.51 \pm 0.01
7	0	0	0	186.8 \pm 6.3	0.62 \pm 0.02
8	-1	0	-1	178.6 \pm 1.6	0.57 \pm 0.03
9	0	+1	+1	182.0 \pm 8.9	0.57 \pm 0.03
10	-1	0	+1	183.8 \pm 4.6	0.51 \pm 0.02
11	-1	-1	0	165.3 \pm 6.4	0.52 \pm 0.02
12	0	0	0	189.7 \pm 2.7	0.60 \pm 0.02
13	+1	0	-1	181.9 \pm 2.5	0.51 \pm 0.02
14	-1	+1	0	190.9 \pm 2.7	0.55 \pm 0.06
15	+1	+1	0	183.3 \pm 6.0	0.55 \pm 0.01

1 El contenido total de betalaínas se evaluó como la suma de betacianinas y betaxantinas por un procedimiento espectrofotométrico de lector de microplacas. Se utilizó un procedimiento residual para separación máxima y análisis (betacianinas y betaxantinas) usando una línea base lineal, Filtro Savitsky-Golay para suavizado y modelo de pico de Gauss.

2 El contenido total de saponinas se calculó a partir de la siguiente curva estándar adaptada: mg de saponina / g FW = [(0,432 \times (altura de la espuma) \times 0,008) / (g FW)] / 10 (Koziol, 1991). Los El factor 10 se relacionó con la concentración de la solución preparada, en el método original es de 100 mg / mL y en las muestras preparadas aquí para extracción asistida por ultrasonido, fue de 10 mg / ml.

Dos espacios de color, un RGB clásico y KLT / PCA menos común, se evaluaron como procedimientos simples para agrupar cascos de quinua roja en base a sus per fi les

de betalaínas. Como procedimiento de referencia, el espectro de absorción del extracto acuoso de betalaínas de 400 a 700 nm se realizó utilizando un lector de microplacas, que es una tecnología analítica de alto rendimiento y costosa. El espectro de absorción para el extracto de quinua del casco acuoso M13 mostró una λ_{max1} a 475 nm y otra λ_{max2} a 540 nm (Fig. 1D), respectivamente relacionados con la presencia de betaxantina o betacianinas. Hay más betaxantina en esta muestra de quinua que las betacianinas. La muestra M5 mostró intensidades de pico aproximadamente iguales en $\lambda_{max} = 475$ nm y 540 nm, pero el pico a $\lambda_{max} = 535$ nm fue el pico predominante en las muestras M1, M2 y M7. Por lo tanto, el casco de quinua M1 y M13 se identificó como muestras que contienen predominantemente betacianinas y betaxantinas.

El histograma RGB de las muestras mostró que el canal azul podía distinguir entre las diferentes muestras de casco de quinua M1 y M13 (Fig. 1B). La relevancia del histograma azul como una variable discriminante para las semillas de quinua de color rojo a rojo anaranjado se relaciona con la respuesta de este canal a los cambios en los tonos rojos (Sorouraddin et al., 2015). Los espectro de reflectancia para semillas enteras adquiridas con un integrado esfera-accesorio en un espectrofotómetro Lambda 950 UV/Vis/NIR confirmó que el histograma azul se puede usar para clasificar muestras de semillas de quinua roja (datos no mostrados).

El espacio de color KLT/PCA mejoró la discriminación entre muestras M1 y M13 e incluso nos permitió establecer tres grupos de quinua: M13; M5 una muestra intermedia; y un grupo único M1, M2 y M7 (figura 1C). En consecuencia, el KTL/PCA muestra que el espacio de color se puede usar para clasificar muestras de semillas de quinua roja usando el análisis de imagen y podría ser una alternativa de bajo costo y no invasiva a la tecnología de lector de microplacas de alto rendimiento para clasificar la quinua roja muestras basadas en sus perfiles de betalaínas (contenido de betacianinas y betaxantinas).

En cuanto al contenido total de betalaínas de las cáscaras de quinua coloreada, el contenido de pigmento varió de 36.6 ± 2.6 a 218.2 ± 12.3 mg/100 g, significativamente más alto que lo que se encontró en las semillas de quinua enteramente coloreadas (Abderrahim et al., 2015; Escribano et al., 2017) (Tabla 4). Las cáscaras de quinua representan alrededor del 3-4% del peso total y, por lo tanto, podrían explicar el mayor contenido de betalaínas en los cascos que en toda la quinua semilla. De acuerdo con el hallazgo de espacio de color KTL/PCA, del grupo de quinua de muestra que fueron muy ricos en betacianinas fueron M1,

M2, M5 y M7 mientras que la muestra M13 tiene el mayor contenido de betaxantina. La proporción de betaxantinas / betacianinas (BXBC-R) de las muestras en el primer el grupo varió entre 0.000-0.266 \pm 0.017 y fue 2.089 \pm 0.089 en la muestra M13 (Tabla 4).

Tabla 4

Contenido total de betacianinas, betaxantinas y betalaínas de cáscaras de quinua coloreada de Altiplano peruano. Los valores son medias \pm SD (n = 3).

Samples	Total betacyanins ^a (mg/100 g FW)	Total betaxanthins ^b (mg/100 g FW)	Total betalains ^c (mg/100 g FW)	Betaxanthin/ Betacyanin
M ₁	82.5 \pm 2.7	17.8 \pm 5.1	100.3 \pm 7.8	0.215 \pm 0.054
M ₂	34.5 \pm 2.5	2.1 \pm 5=0.2	36.6 \pm 2.6	0.062 \pm 0.050
M ₅	89.6 \pm 3.3	23.9 \pm 2.1	113.5 \pm 5.1	0.266 \pm 0.017
M ₇	83.5 \pm 5.0	0.0 \pm 0.0	83.5 \pm 5.0	0.000 \pm 0.000
M ₁₃	70.7 \pm 5.4	147.4 \pm 7.5	218.2 \pm 12.3	2.089 \pm 0.089

a Se utilizó un procedimiento residual para la separación y el análisis de los picos (betacianinas y betaxantinas) utilizando una línea base lineal, un filtro Savitsky-Golay para alisar y pico de Gauss tipo modelo a Total de betacianinas (MW = 550,46 g / mol).

b betaxantinas (PM = 538,35 g / mol) se cuantificaron a partir de la absorbancia estimada utilizando coeficientes de extinción molar de 60,000 y 48,000 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente.

c El contenido total de betalaínas se evaluó como la suma de betacianinas y betaxantinas por un procedimiento espectrofotométrico de lector de microplacas. M1 = Pasankalla rojo, M2 = Rosa Pasankalla, M5 = Red Chullpi, M7 = Capachica rosa y M13 = Pasankalla rojo brillante.

De acuerdo con nuestros resultados, un anterior estudio realizado por nuestro grupo de investigación demostró que el BXBC-R varió entre 0.0 y 0.55 en muestras de quinua roja recolectadas de Perú Región del Altiplano (Abderrahim et al., 2015). De la misma manera, un estudio recientemente llevado a cabo con muestras de quinua de colores del germoplasma Banco en la Universidad Nacional de Agricultura La Molina (Lima, Perú), mostró un alto contenido de betacianinas en muestras rojas medidas por HPLC con BXBC-R de 0.07 a 0.34 (Escribano et al., 2017). En acuerdo con propiedades de color analizadas por análisis de imágenes, el M1 (BXBC-R = 0.215 \pm 0.054) y M13 (BXBC-R = 2.089 \pm 0.089) son razones representantes e indican diferentes muestras de quinua roja, y por lo tanto,

fueron elegidos para optimizar betalaínas por UAE. La muestra M13 no había sido estudiado previamente y es único, ya que contiene una mayor cantidad de betaxantinas que betacianinas.

3.2. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de betalaínas de cáscaras de quinua utilizando metodología de superficie de respuesta

3.2.1. Análisis de los modelos

Se utilizó un diseño Box-Behnken para optimizar la extracción de betalaínas de cáscaras de quinua (muestra M1 y M13) por ultrasonido (Tabla 1-3). Para la muestra de quinua M1, que tenía un mayor contenido de betacianinas que las betaxantinas, el modelo de regresión ANOVA ($p < 0.001$) y R^2 ajustado (0,99) confirmó que el modelo cuadrático producido buena estimación del total de betalaínas. La falta de ajuste no fue significativa ($p = 0.173$), lo que significa que el contenido total de betalaínas puede ser exactamente predicho usando el modelo cuadrático obtenido. Lo óptimo condición para las betalaínas EAU de la muestra de quinua M1 fueron: amplitud = 70%; ciclo = 0.6 y una extracción muy corta tiempo = 9.2 s; estos tratamientos óptimos de ultrasonido podrían extraer 96,477 mg de betalaínas por 100 g de FW (Fig. 2). Del mismo modo, otro modelo cuadrático dio una buena predicción de la cantidad de betalaínas extraído de cascotes de quinua M13 mediante regresión ANOVA por ultrasonido modelo ($p < 0.001$); $R^2 = 0,94$; falta de ajuste ($p = 0.695$). En este último caso, las condiciones óptimas para UAE de betalaínas de cáscaras de quinua, las muestras fueron: amplitud = 90%; ciclo = 0.7 y extracción corta tiempo = 40 s; estas condiciones produjeron 201.01 mg de betalaínas por 100 g FW (Fig. 3). Curiosamente, para ambas muestras de cascote de quinua, la operación de equipo de ultrasonido en modo de pulso (ciclos) fue requerido para una óptima extracción de betacianinas y betaxantinas.

Con el fin de comparar las condiciones de los EAU para la extracción de betalaínas de diferentes fuentes vegetales, el consumo específico de energía EUS (J / g) era calculado a partir de la ecuación ($EUS = potencia\ de\ salida \times tiempo\ de\ extracción\ o\ tratamientos\ de\ ultrasonido / peso\ de\ la\ muestra$) informados por Koubaa et al. (2016). Dado que el ultrasonido es una onda mecánica, sus características, como frecuencia y amplitud, que dependen del ultrasonido aparato- puede regular la intensidad ultrasónica (Chemat et al., 2017).

Cuando se usa EAU para extraer betalaínas de cascos de quinua, el sonotrodo diámetro (0.5 mm), densidad de potencia acústica (125 W / cm²) y amplitud, ciclos o pulso y peso de la muestra se utilizaron para calcular EUS. Se encontraron valores de EUS = 3.1 J / gy 13.6 J / g para el M1 y Cáscara de quinua M13, respectivamente. Los diferentes tiempos de extracción de ultrasonido requerido para los cascos de quinua M1 y M13 podría estar relacionado con su contenido de betacianinas y betaxantinas (Fig. 1D). Un estudio previo ha demostrado que las betacianinas requieren menos tiempo de extracción (90-120 s) que betaxantina (140-150 s) en una extracción usando tecnología de microondas (Cardoso-Ugarte et al., 2014). Además, la EUA para la cáscara de quinua marcadamente inferior a los utilizados para extraer betalaínas por los EAU de malabar espinacas - EUS = 981.3 J/g- (Maran y Priya, 2015), tallos de remolacha roja -EUS = 934.5 J / g- (Maran y Priya, 2016) y tuna roja cáscaras y pulpas -364 a 1090 J / g- (Koubaa et al., 2016). Los rendimientos de extracción con tratamiento de ultrasonido pueden variar debido a la matriz de la planta estructura, plasticidad o diferencias de composición que darán como resultado diferentes grados de impacto de los efectos de la cavitación (Chemat et al., 2017). Por lo tanto, diferentes rendimientos de betalaínas de la fruta del dragón rojo fueron obtenido usando EUA para la piel (47.07%) y carne (90.08%) (Ramli et al., 2014). Los valores de EUA encontrados con los EUA para las betalaínas del cáscara de quinua sugieren que esta planta es una buena fuente de estos pigmentos, que son fácil y rápidamente extraídos. Un breve proceso de ultrasonido lo hizo posible para extraer cantidades de betalaínas similares a las obtenidas por convencional Sacudida "móvil rod", que requiere 30 minutos de tiempo de extracción en cambio, 10-40 s (Fig. 4).

3.2.2. Efecto de la amplitud, el ciclo y el tiempo de extracción en el contenido total de betalaínas

Para la muestra de quinua M1, el modelo mostró que el más significativo variable lineal que influye en el contenido total de betalaínas fue tiempo de extracción (valor F = 192.72, p <0.001), seguido de ciclo (F value = 117,39, p <0,001). Sin embargo, la amplitud no tenía ningún significado efecto sobre el contenido total de betalaínas (valor F = 1.15, p > 0.05). Mientras tanto, todo el término cuadrático y la interacción bidireccional (p <0.01), excepto la interacción entre el ciclo y el tiempo de extracción (Fvalue = 3.51, p > 0.05) tuvo un efecto significativo sobre el contenido total de betalaínas. Para el casco de quinua M13,

el contenido total de betalaínas fue significativo influenciado por la amplitud (valor $F = 15.99$, $p < 0.05$) y tiempo de extracción (valor $F = 11.86$, $p < 0.05$) y no tuvo se encontró un efecto para el ciclo (valor $F = 3.98$, $p > 0.05$). Término cuadrático para ciclo (valor $F = 12.27$, $p < 0.05$) e interacción entre amplitud y el ciclo (valor $F = 27.16$, $p < 0.001$) tuvo un efecto significativo sobre el contenido total de betalaínas.

Los gráficos de superficie de respuesta demuestran la relación entre Parámetros de EAU (amplitud, ciclo y tiempo de extracción) y el total contenido de betalaínas (figuras 2 y 3). Para la muestra de quinua M1, total contenido de betalaínas se incrementó con el ciclo y el tiempo de extracción (Fig. 2A-C). Un estudio previo ha demostrado que el ciclo (modo de pulso) operación) aumenta la eficiencia de los EAU debido a que promueve una no constante transferencia de masa del estado (Sivakumar et al., 2009). Sin embargo, ciclo inferior no podría ser suficiente para completar la extracción de betalaínas porque reduce el tratamiento de ultrasonido.

Por otro lado, los contenidos totales de las betalaínas aumentaron con el aumento del tiempo de extracción y alcanzaron su pico a aproximadamente 10 s (Fig. 2C). Después de ese valor, el tiempo de extracción tenía un efecto negativo sobre el contenido total de betalaínas (Fig. 2C), que podría estar relacionado con una degradación de betalaínas por especies reactivas de oxígeno generado por un tiempo más largo de cavitación acústica (Kentish y Ashokkum, 2011; Roriz et al., 2017). Del mismo modo, la tendencia de amplitud aumenta el contenido total de betalaínas es un valor intermedio (Fig. 2C).

En el caso de la cáscara de quinua M13, el contenido total de betalaínas se incrementó con la amplitud y el tiempo de extracción (Fig. 3A-C). Es conocido, bueno esa intensidad ultrasónica está directamente relacionada con la amplitud del transductor y, en consecuencia, a la amplitud de presión de la onda de sonido.

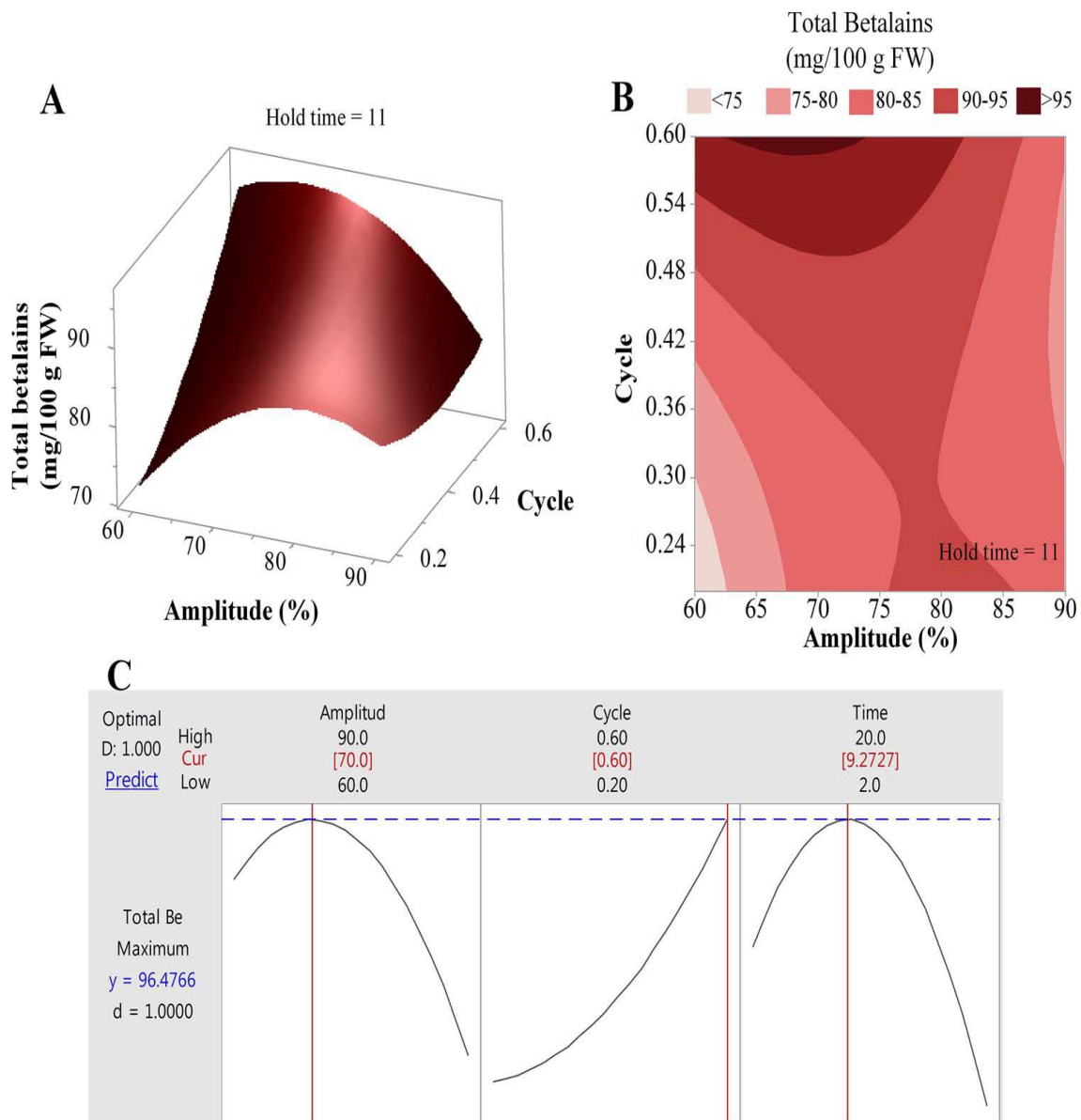


Figura. 2. Gráfico de superficie de respuesta (A) y contorno (B) para Emiratos Árabes Unidos de betalainas de colores que contienen betacianinas cascós de quinua (M1). Las condiciones óptimas para la extracción de betalainas se muestra en (C). El máximo la extracción total de betalainas fue 96.47 mg / 100 g FW. Los valores son media \pm SD de mediciones por triplicado.

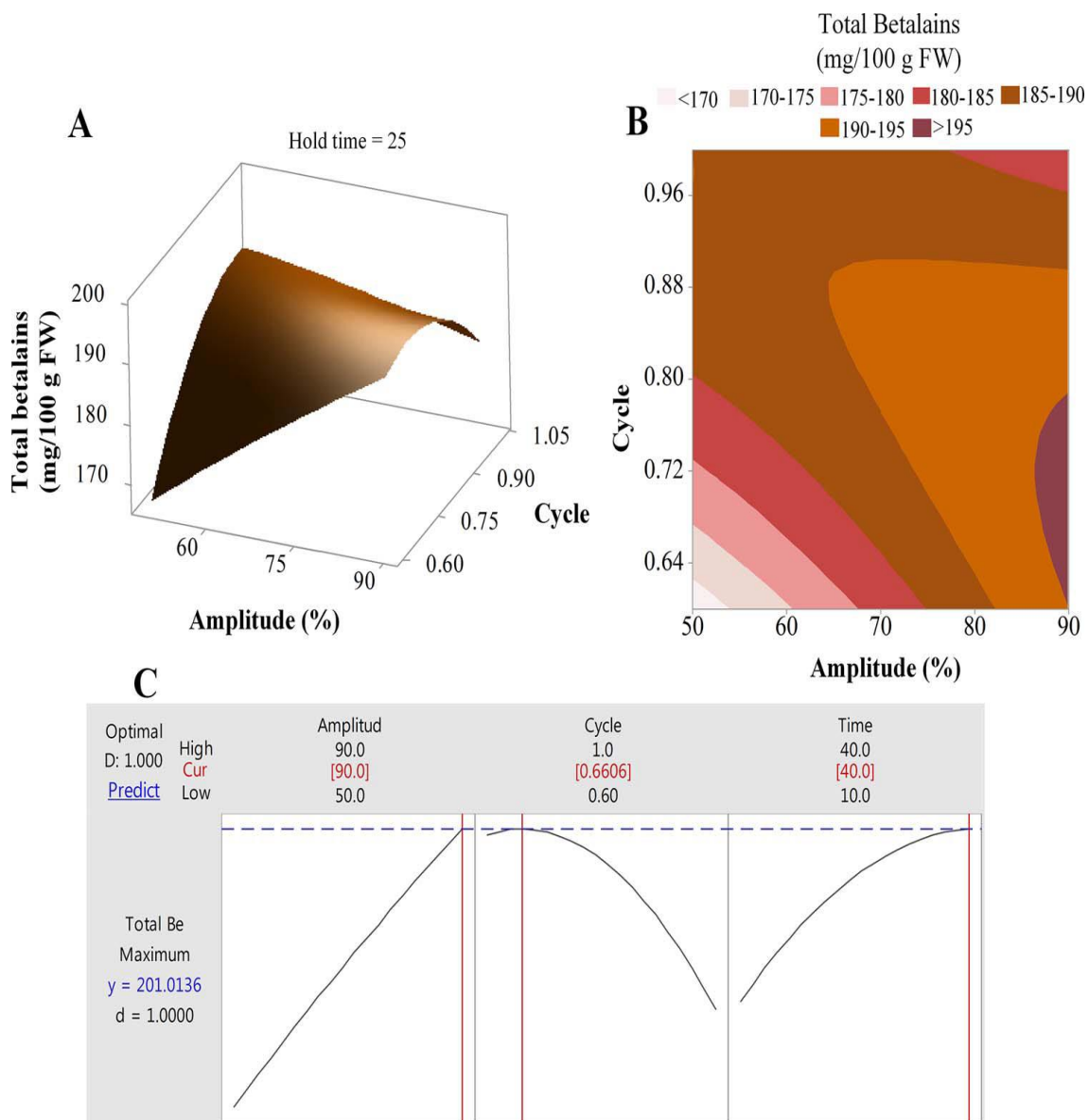


Figura 3. Gráfico de superficie de respuesta (A) y contorno (B) para Emiratos Árabes Unidos de betalaínas a partir de betaxantinas que contienen cascos de quinua (M13). Condiciones óptimas para betalaínas extracción se muestran en (C). El total máximo la extracción de betalaínas fue de 201.01 mg / 100 g FW. Valores son medias \pm SD de mediciones por triplicado.

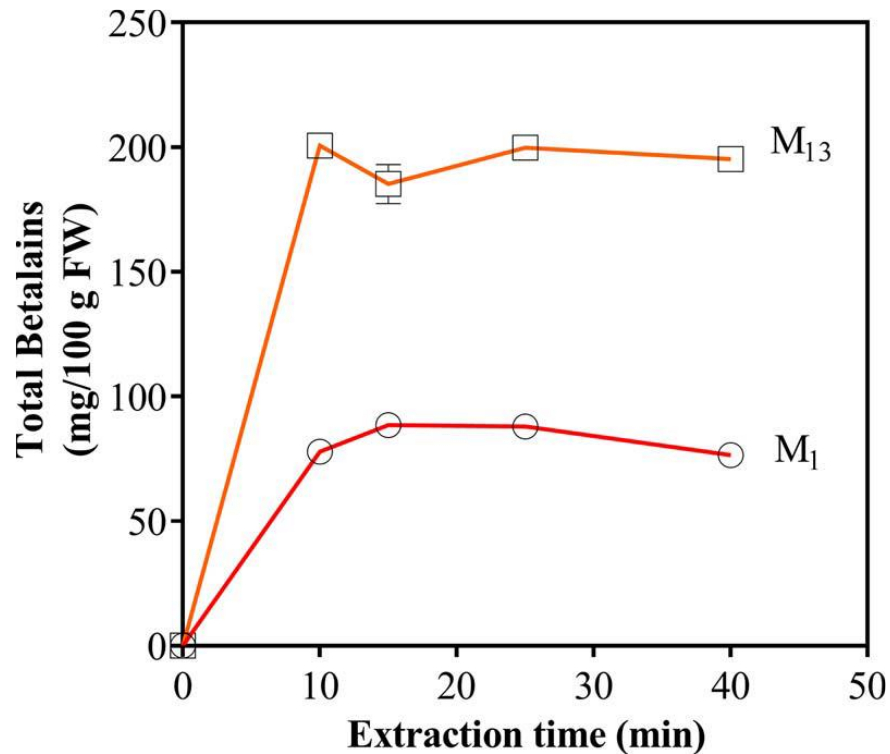


Figura 4. Extracción convencional de betalaínas de cáscaras de quinua. Una coctelera "móvil rod" era usado para extraer betalaínas a temperatura ambiente. M₁ y M₁₃ son muestras de quinua que respectivamente contienen principalmente betacianinas o betaxantinas. Los valores son media \pm DE por triplicado mediciones.

Por lo tanto, un aumento en la amplitud generalmente resulta en un aumento de la sonoquímica efectos y rendimiento de extracción (Chemat et al., 2017; Maran y Priya, 2015). Del mismo modo, un aumento en el tiempo de extracción está asociado con la potencia de entrada y mejora la extracción por ultrasonido (Chemat et al., 2017). Por otra parte, la tendencia del ciclo para aumentar la EAU el rendimiento de betaxantinas para la muestra M₁₃ alcanzó el valor máximo para un valor de ciclo alrededor de 0.6 (Fig. 3C).

Por otro lado, la EAU de betalaínas de cáscara de quinua no era completamente selectivo ya que las saponinas también se extrajeron junto con betalaínas para todas las carreras usando el diseño Box-Behnken. Contenido total de saponinas entre 0,69 y 1,14 mg / g FW, y 0,51 y 0,62 mg / g FW se encontraron en las cáscaras de quinua M₁ y M₁₃, respectivamente (Tabla 2 y 3 y la Fig. 2 complementaria). La ventaja de eliminar totalmente las saponinas del extracto de betalaínas debe evaluarse porque las saponinas tienen varias propiedades biológicas beneficiosas (Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017). Las saponinas podrían conferir un único y bifuncional propiedades farmacológicas en los

extractos M1 y M13. A partir de un punto de vista tecnológico, la microencapsulación del extracto podría reducir el sabor amargo y también mejoraría la estabilidad de las betalaínas (Otálora et al., 2015).

3.3. Estabilidad térmica de betalaínas extraídas de cáscaras de quinua por ultrasonido

Aprobado como un colorante natural, las betalaínas se han usado en diferentes productos alimenticios como dulces, yogurt, helado, aderezo para ensaladas, mezcla de bebidas en polvo, refrescos y gelatina de postre. Sin embargo, comparado a los tintes sintéticos, su uso más amplio está muy limitado por su poca estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento (Celli y Brooks, 2017; Delgado- Vargas et al., 2000). Diferentes factores como alta temperatura, luz y se informó que la presión de oxígeno reduce la estabilidad de las betalaínas, afectando así la vida útil de los alimentos que contienen betalaína (Khan, 2016).

La naturaleza química de las betalaínas, incluido su grado de glucosilación y la acilación, también afecta su estabilidad y varía con la fuente de donde se extrajo el pigmento (Khan, 2016). A diferencia de otras fuentes de betalaínas, una publicación reciente ha demostrado que muestras de quinua del Altiplano peruano contienen importantes cantidades de amaranthin (121.9-148.6 mg / kg FW), isoamarantin (108.3-145.5 mg / kg FW) y dopaxantina (35.9-85.3 mg / kg FW) (Escribano et al., 2017). Este hallazgo sugiere que la estabilidad térmica de betalaínas extraídas de cascos de quinua de colores puede ser diferente de betalaínas de otras fuentes y esto debe ser evaluado.

Al igual que las betalaínas de remolacha (BR), las betalaínas de quinua M1 y M13 mostró una cinética de reacción de degradación de primer orden a 90 ° C (Fig. 5C). Un informe reciente ha demostrado que la degradación térmica de las betalaínas de remolacha en presencia de leche también siguió a reacción de primer orden de las sustancias químicas a 70-90 ° C, es decir, el aumento de la temperatura y el calentamiento se asocian a una mayor degradación (Fernández - López et al. 2013; Güneşer, 2016). Además, nuestros datos demostraron que la degradación de las betalaínas puede controlarse mediante un simple análisis de imágenes basado en teléfonos inteligentes utilizando la distancia euclidiana de los valores de color del espacio RGB y HSV (figura 5B-C). Un estudio previo ha establecido que el contenido de betalaínas puede predecirse a partir de un modelo de regresión múltiple basado en el colorímetro durante el tratamiento térmico (Chandran et al.,

2014; Güneşer, 2016). La estabilidad térmica de las betalaínas extraídas de la muestra de quinoa M1 fue similar a la de las betalaínas de remolacha (BR) a 90 ° C (Fig. 5C) con constantes de velocidad de primer orden (k) de $0,068 \pm 0,003$ y $0,067 \pm 0,007$ min. ⁻¹ y la vida media ($t_{1/2}$) de 10.2 y 10.4 min, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5

Los parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas extraídas por ultrasonidos basadas en cambios en los valores de color. Los valores son medias \pm SD (n = 3).

Samples	RED ₀	First-order reaction kinetic parameters ¹			
		Plateau	Half-life ($t_{1/2}$) (min)	k (min ⁻¹)	R ²
M ₁	100.2 \pm 1.6 ^a	17.8 \pm 1.1 ^a	10.2	0.068 \pm 0.003 ^a	0.99
M ₁₃	103.0 \pm 3.9 ^a	ND	37.0	0.019 \pm 0.008 ^b	0.97
BR	99.9 \pm 2.5 ^a	25.3 \pm 1.8 ^b	10.4	0.067 \pm 0.007 ^a	0.99

¹ Un modelo exponencial siguiendo el $rED = (rED_0 - \text{Plateau}) e^{-k \cdot t} + \text{Plateau}$ era utilizado para ajustar datos experimentales. rED y rED₀ son ED relativa a diferentes tiempos de calentamiento (t, min). La meseta es un valor rED mínimo en la región de la meseta, k es la reacción de primer orden constante de velocidad, y la vida media es el tiempo de calentamiento necesario para reducir el valor de rED en un 50% (calculado a partir de K). Las letras indican diferencias en la significancia estadística. ND significa a se encontró un error estándar muy alto para el parámetro.

La estabilidad térmica de las betalaínas extraídas de la muestra de quinoa M1 fue similar a la de las betalaínas de remolacha (BR) a 90 ° C (Fig. 5C) con constantes de velocidad de primer orden (k) de $0,068 \pm 0,003$ y $0,067 \pm 0,007$ min. ⁻¹ y la vida media ($t_{1/2}$) de 10.2 y 10.4 min, respectivamente (Tabla 5). La estabilidad térmica a 90 ° C fue más alta para las betalaínas de la muestra de quinoa M13 que para las extraídas de las muestras M1 y BR, $k = 0.019 \pm 0.008$ min⁻¹ y $t_{1/2} = 37$ min. Estudios previos en la estabilidad térmica en las betalaínas de remolacha ha encontrado una $k = 0.91$ h⁻¹ (0.015 min⁻¹) y $t_{1/2} = 0.79$ h (47.4 min) (Fernández-López et al., 2013) o $k = 0.0109$ min⁻¹ y $t_{1/2} = 64$ min a 90 ° C (Chandran et al., 2014). En un estudio reciente, la cinética de degradación de las betalaínas en la remolacha a 90 ° C en la leche se produjo rápidamente con $k = 0.031 \pm 0.003$ min⁻¹ y $t_{1/2} = 22.5$ min (Güneşer, 2016). La divergencia en los parámetros cinéticos para la degradación de las betalaínas en las remolachas podría estar relacionada con la presencia

de compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico o fenólicos, que dependen de la composición de la matriz y los procedimientos de extracción. Se sabe que el ácido ascórbico aumenta la estabilidad de las betalaínas, pero el efecto de co-pigmentación de un compuesto fenólico depende del compuesto químico fenólico y requiere más estudios (Khan, 2016).

En las betalaínas, la degradación térmica se produce a través de reacciones complejas como isomerización, deshidrogenación, descarboxilación e hidrólisis que producen varios cambios cromáticos y estructurales (Azeredo, 2009; Khan, 2016). El valor $t_{1/2}$ para betalaínas de la muestra quinoa M13 estaba en el mismo intervalo que betalaínas extraídas de un cereal taiwanés nativo, Djulis (*Chenopodium formosanum*) (18,33-63,76 min a pH 3-7 a 90 ° C) (Tsai et al., 2010). El extracto de cereal Djulis contenía principalmente betanina e isobetanina (77.3%) y fracciones más bajas de amaranthin (13.6%) e isoamarantina (8.6%) (Tsai et al., 2010). Con base en las propiedades de color y el espectro de absorción, las muestras de quinua M13 podrían contener cantidades significativas de betaxantinas (Escribano et al.).

Finalmente, la presencia de saponinas en el extracto de betalaínas no afectó la estabilidad del pigmento ya que los valores k y $t_{1/2}$ a 90 ° C fueron iguales para el extracto que contiene saponinas y para el cual las saponinas se eliminaron parcialmente por agitación como procedimiento afrosimétrico (datos no mostrados). Sin embargo, los efectos de las diferentes concentraciones de saponinas sobre la estabilidad térmica de las betalaínas del casco de quinua aún no se han estudiado.

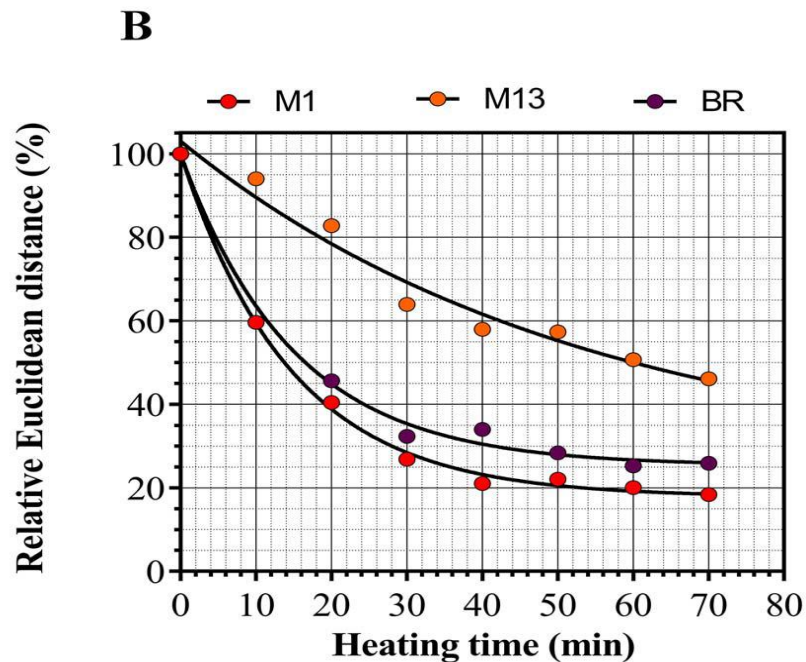
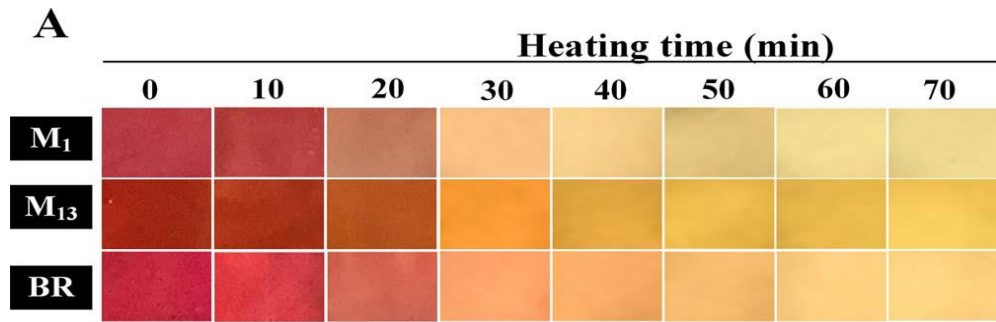


Figura 5. Estabilidad térmica de la betalaínas a partir de cáscaras de quinua coloreados extraídos en agua por ultrasonido. El robot cooker se usó para calentar extractos a 90 ° C por diferentes tiempos en agitación de velocidad más baja y muestreada cada 10 minutos para el análisis de imágenes. Un iPad Air era utilizado para adquirir una imagen de extracto (B). Distancia euclidiana relativa (media \pm DE por triplicado mediciones), en base a los valores RGB y HSV medidos con la aplicación gratuita de Android ON color Measure, se utilizó para controlar la estabilidad de la betalaínas. BR es una betalaínas extraída de vapor comercial cocido remolachas.

3.4. Microencapsulación de betacianinas de quinua mediante secado por pulverización

Se aplicó un diseño compuesto central centrado en la cara para evaluar el efecto de la pulverización proceso de secado (temperatura de entrada del aire y caudal) y la formulación (maltodextrina de 10 concentración) en las variables de respuesta. Betacianina microencapsulada, color CIELab, humedad, la densidad aparente y el rendimiento se

midieron como respuestas (Tabla 6). Desde un punto de vista práctico, solo se utilizó betacianina encapsulada para optimizar el proceso de secado por pulverización. Este parámetro se midió como la absorbancia a 540 nm, que es la longitud de onda de absorción máxima de extracto acuoso de quinua de color y está relacionado con su contenido de betacianina (Suplemento Figura 6).

Además, la betacianina microencapsulada es igual a la betacianina total de las micropartículas porque se encontró que la betacianina superficial era cero; es decir, el proceso de secado por pulverización empleado en el presente estudio atrapó la betacianina de las microencapsulas en la matriz de maltodextrina. Esto significa que la eficiencia de encapsulación de betacianina, un parámetro previamente descrito, fue del 100% en cada experimento de secado por pulverización. Este valor era más alto que el 95.5% a 99.7% reportado para la microencapsulación de extractos de pera de cactus (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014).

La betacianina de quinua microencapsulada mostró una levedad del color (Figura 5 complementaria), valores de 83.00 ± 0.34 a 92.86 ± 0.10 , más bajos que los encontrados para la pera de cactus púrpura encapsulado con 10% de maltodextrina ($L = 27.00 \pm 0.85$) (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, y Yáñez-Fernández, 2015). El valor de L encontrado en la quinua betaencapsulada fue relacionado, en parte, con la concentración de maltodextrina; de hecho, aumentando la maltodextrina la concentración aumentó los valores de L (Tabla 6). El valor L más alto se ha encontrado para microencapsulado jugo de remolacha betaína en 12,5% de maltodextrina (Janiszewska, 2014), pero los valores a y b fueron diferentes de los encontrados aquí para la quinua microencapsulada betacianina. Por lo tanto, los valores de CIELab pueden verse influenciados por la concentración de betaína microencapsulada e incluso por la estructura química de la betaína, ya que un alto se ha encontrado una proporción de vulgaxantina-I en el jugo de raíz de remolacha (Janiszewska, 2014). De hecho, en quinua microencapsulada betacianina, la absorbancia a 540 nm -directamente relacionada con contenido de betacianina- se correlacionó muy bien con las mediciones de color con Pearson coeficientes de correlación de -0.8706 ($p < 0.0001$), 0.8703 ($p < 0.0001$), 0.8608 ($p < 0.0001$) y 0,7336 ($p < 0,001$) para los valores L, a, C y h, respectivamente. Esto abre la posibilidad de evaluar la concentración de betacianina en la quinua y probablemente en otras muestras utilizando no análisis invasivo de imágenes. La concentración de betaína en las

microencapsulas puede ser influenciado por el contenido de betalaina de los extractos. Por ejemplo, el secado por pulverización microencapsulación de extracto de betaína de nopal (*Opuntia ficus-indica* y *Opuntia stricta*) produjo valores CIELab de color completamente diferentes (L = 69.9 y 65.6; a = 17.2 y 34.7; b = -7.2 y 8.23 para *Opuntia ficus-indica* y L = 16.23-37.2, a = 17.26-40.9 y b = 6.26-15.46 para *Opuntia stricta*) (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, y Yáñez-Fernández, 2015; Saéñz, Tapia, Chávez, y Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). Los valores de CIELab encontrados para la quinoa betacianina orgánica microencapsulada (Tabla 1) fueron casi lo mismo que los reportados por Vergara et al. (2014) y Otárola et. Alabama. (2015).

Los parámetros tecnológicos de secado por aspersión, como la humedad, la densidad aparente y el rendimiento encontrados en la betacianina microencapsulada cayó en el rango de valores encontrados en estudios previos. El nivel de humedad, que oscila entre 2.14% y 8.26% (Tabla 1) fue similar a los encontrados (1.87-6.95%) para la encapsulación de betaína de pera de nopal púrpura en gelatina-maltodextrina por secado por pulverización en un secador Buchi en el IAT entre 110 ° C y 140 ° C (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, y Yáñez-Fernández, 2015) y la encapsulación de betacianina de amaranto en maltodextrina (1.95-6.80%) en IAT de 150 a 210 ° C. IAT es el factor más importante afectando las propiedades fisicoquímicas del polvo secado por atomización. Una temperatura de IAT más alta suministra más calor a la cámara de secado, reduciendo así el contenido de humedad del producto secado por pulverización (Cai y Corke, 2000; Shishir y Chen, 2017).

De la misma manera, la densidad aparente de quinua microencapsulada (0.41-0.55, Tabla 6) fue ligeramente inferior a descrita para betacianina de amaranto encapsulada (0.52-0.67) (Cai & Corke, 2000). Las altas temperaturas de pueden influir en la porosidad o fragmentación de las partículas debido a una tasa de evaporación de agua rápida que reduce la densidad aparente del polvo secado por pulverización (Fazaeli, Emam-Djomeh, Kalbasi Ashtari, y Omid, 2012; Kha, Nguyen, y Roach, 2010). Micropartículas de quinua betacianina no mostraron ninguna fragmentación bajo IAT entre 140 ° y 180 ° C (Figura 8A-8B). De acuerdo con nuestros hallazgos, la fragmentación de micropartículas no se ha mostrado a una temperatura de secado de 180 ° C (Cai y Corke, 2000). Finalmente, el rendimiento de secado por pulverización de quinua betacianinas varió de 17.66 a 43.01% (Tabla 6), lo que concuerda con el 16.4% de rendimientos reportados para betaínas encapsuladas con maltodextrina de frutos de cactus (Otárola, Carriazo, Iturriaga,

Nazareno, y Osorio, 2015) y que oscilaron entre 15.5% y 71.5% en almidón modificado (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). El diseño compuesto central centrado en la cara aplicado al secado por pulverización de quinina betalaínas con maltodextrina de 10 como agente encapsulante mostró que el modelo cuadrático era significativo ($p < 0,0001$) para betacianina microencapsulada medida como absorbancia total a 540 nm con $R^2 = 0,9855$. R^2 ajustado = 0.9724 y R^2 predicho = 0.8703. A baja (140 ° C) y alta (180 ° C) IAT, la absorbancia a 540 nm fue menor que los valores intermedios para el flujo de aire entre 40 mm (667 L / h) y 60 mm (1744 L / h) (Figura 1A). Las temperaturas de secado que van desde 133 ° C hasta 144 ° C han sido reportadas como óptimas para la microencapsulación de betalaína de nopales en el flujo de aire más bajo (≤ 600 L / h) (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, y Yáñez-). Fernández, 2015; Saézn, Tapia, Chávez, y Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García, y Robert, 2014). Sin embargo, la absorbancia a 540 nm para la quinoa betacianina microencapsulada se redujo por debajo de la región óptima en IAT = 180 ° C (Figura 1A). Usando *amaranthus 291* betacianina, Cai y Corke (2000) han demostrado que una temperatura de secado más alta (> 180 ° C) aumenta la pérdida de betacianina. De acuerdo con estudios previos, el aumento de la maltodextrina 10 (10-30%) redujo la absorbancia a 540 nm (Figura 1B y 1C). Por ejemplo, al aumentar la concentración de maltodextrina (3-10%) redujo el licopeno y el total de carotenoides en zumos de sandía en polvo (Oberoi y Sogi, 2015). La reducción informada en la concentración de los compuestos bioactivos encapsulados se ha asociado con una elevada cantidad de maltodextrina incorporada en la muestra secada por pulverización. Por el contrario, se observó un aumento en el contenido de licopeno en polvo de jugo de guayaba rosado secado por aspersión con concentraciones más altas de maltodextrina (10-20%), pero hubo una ligera reducción de alrededor de una concentración de 17-20% de maltodextrina (Patil, Chauhan, y Singh, 2014).

Una explicación plausible para este informe contradictorio es la mejora en la estabilidad de los compuestos bioactivos producida por el aumento de las concentraciones de encapsulación (Murali, Kar, Mohapatra y Kalia, 2015). Se ha sugerido que esta reducción en la tasa de degradación con mayores proporciones de maltodextrina disminuye la betacianina superficial en las microcapsulas del extracto de amaranto (Cai y Corke, 2000). Sin embargo, bajo las condiciones de secado por pulverización empleadas para extraer betacianina de la quinua, se encontraron cero niveles de betacianina superficial en el producto encapsulado. Por otro lado, la alta velocidad de flujo de aire de

secado no influyó en el extracto de quinoa betacianina (Figura 1C), aunque la densidad aparente fue menor (Tabla 6). Sin embargo, una velocidad de flujo de aire de secado más baja aumenta el tiempo de secado de la gota en comparación con las velocidades de flujo más altas (Goula, Adamopoulos, & Kazakis, 2004). Las condiciones óptimas de secado por aspersión para quinua betacianina fueron predichas por un modelo cuadrático como IAT = 165.1 ° C, velocidad de flujo de aire de secado (AR) = 47 mm (rotámetro) y concentración de maltodextrina (MD) = 10% (p / v) con una absorbancia de a 540 nm igual a 0,444 (deseabilidad de 0,9) (Figura 8D).

3.2. Caracterización de betacianinas optimizadas microencapsuladas a partir de extracto de quinua

3.2.1. Actividad de agua y contenido de humedad

La actividad de humedad y agua de los microencapsulados de quinua beta optimizados en fue de $1.64 \pm 0.08\%$ y 0.127 ± 0.006 , respectivamente (Tabla 7). Estos valores fueron inferiores a los encontrados para pulpa microencapsulada y extracto de pera de nopal ultrafiltrado (humedad = 3.7-5.1% y actividad de agua = 0.23-0.30), que fueron secados por pulverización a 133 ° C 320 (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, y Robert, 2014). De manera similar, se han encontrado baja humedad (2.96 ± 0.03) 321 y actividad de agua (0.25 ± 0.00) para cactus microencapsulado con maltodextrina betalainas usando maltodextrina como agente encapsulante a 140 ° C (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, Yáñez- Fernández, 2015). Las diferencias observadas en los niveles de actividad de humedad y agua de las sustancias microencapsuladas podrían explicarse por las diferencias en la temperatura del aire utilizada en el secado por pulverización; en nuestra condición óptima, se usó una alta temperatura de secado (165° C) en quinua betacianinas microencapsuladas. Estudios previos han demostrado que el contenido de humedad y la actividad del agua de los productos en polvo disminuyen con un aumento en IAT (Cai y Corke, 2000).

La actividad de agua (0.148 ± 0.005) de polvo del extracto de hierba mate preparada por secado por pulverización a 160 ° C fue similar a la encontrada en el presente estudio, aunque se ha informado de un contenido de humedad mayor de (3.09 ± 0.08) a pesar de la maltodextrina Se utilizó de 10 (30% p / v) en el secado por pulverización (Negrão-Murakami, et al., 2017). Un estudio anterior ha demostrado que las concentraciones más altas de maltodextrina disminuyen la actividad tanto de humedad como de agua de los productos en polvo (Shishir y Chen, 2017).

3.2.2. Medición de color

Contenido de betacianina, rendimiento de encapsulación y contenido de saponina
Mediciones de color para la quinoa betacianina microencapsulada optimizada (Tabla 7) valores apareados informados por Vergara et al. (2014) para la microencapsulación de pulpa y extracto de pera de cactus ultrafiltrado en cápsulas de almidón modificado.

La betacianina microencapsulada exhibió un grado de enrojecimiento ($a = 17.09 \pm 0.09$) con un brillo ($C = 349.64 \pm 0.15$) similar a que se encontró en el nopal microencapsulado (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). Sin embargo, la quinoa betacianina microencapsulada optimizada mostró un valor de L ($81,96 \pm 0,44$) más alto que el de la pulpa de cactus microencapsulada o ultrafiltrada ($69,9 \pm 0,0$ y $68,1 \pm 0,6$, respectivamente) (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014) o zumos clarificados microencapsulados de cactus morado (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, y Yáñez-Fernández, 2015). Esto puede explicarse por el mayor contenido de betacianina en pulpa y cactus ultrafiltrado (36.00 ± 0.03 mg de betanina / 100 g) (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014), mientras que la betacianina microencapsulada con maltodextrina de quinoa niveles más bajos de betacianina ($19,95 \pm 0,17$ mg de betanina / 100 g). De hecho, los valores de L para microencapsulados de betacianina de quinua se correlacionaron negativamente con la absorbancia a 540 nm - relacionados con su contenido de betacianina- (-0.8706 , $p < 0.0001$). Estas asociaciones entre el contenido de betalato y los valores de L se han informado anteriormente para la quinua de color rojo (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas, González y Condezo-Hoyos, 2015). Por el contrario, a pesar del contenido de betalaínas (11.33 - 35.93 mg / 100g) de productos microencapsulados de extracto de pera púrpura (*Opuntia stricta*) que son similares a los de quinua beta microencapsulada optimizada , los valores de L fueron marcadamente diferentes (17.16 - 37.20) (Castro-Muñoz, Barragán- Huerta, y Yáñez-Fernández, 2015). Por otro lado, esta quinua betacianina microencapsulada contiene una baja cantidad de saponina (<8 mg / 100 g), que, según un informe de Koziol (1991), no debería ser suficiente para conferir un sabor amargo al producto en polvo . Además de la estabilización con betacianina, la microencapsulación podría reducir aún más el sabor amargo de la quinoa betacianina microencapsulada. El contenido de saponina que se encuentra en las microcápsulas optimizadas podría contribuir a producir un ingrediente único y multifuncional con varias propiedades farmacológicas.

Por ejemplo, las saponinas triterpénicas de la quinua pueden inducir apoptosis en las células cancerosas HeLa, como se confirma mediante análisis de citometría de flujo (Kuljanabhadgavad, Thongphasuk, Chamulitrat y Wink, 2008). Finalmente, la encapsulación rendimiento (58.1%) de microencapsulación de quinua optimizada fue menor a la reportada para pulverización: pulpa de cactus seca (65.3%) y cactus ultrafiltrado (62.6%) (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, y Robert, 2014) Sin embargo, el nivel fue más alto que en los microencapsulados de cactus (16.4%) (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno y Osorio, 2015).

3.2.3. Las micro cápsulas de betacianina de quinua de disolución

Mostraron un valor de disolución de 349.50 ± 2.12 s, que fue ligeramente menor que el informado anteriormente para hierba mate concentrada secada por atomización (385.05 ± 14.9 s) encapsulada en maltodextrina (30% p / v) DE 10.2 (Negrão-Murakami, et al., 2017). El aumento de la concentración de maltodextrina aumentó el tiempo de disolución de microencapsulado quinoa betacianina a 446.5 ± 20.5 sy 537 ± 1.4 s para 10 y 30% p / v de maltodextrina. De acuerdo con nuestros resultados, los tiempos de reconstitución disminuyeron a bajas concentraciones de maltodextrina debido a que la cantidad de maltodextrina reduce la solubilidad del polvo (Oberoi y Sogi, 2015). La disolución es una medida de la velocidad de reconstitución de polvos secos en agua (Oberoi y Sogi, 2015).

3.2.4. Tamaño de partícula y morfología

Microcápsulas de betacianina de quinua optimizadas las condiciones de secado por pulverización (IAR = 165 ° C, FAR 380 = 50 mm y 10% p / v de maltodextrina DE 10) mostraron un diámetro equivalente (no se obtuvo una partícula esférica , ver discusión a continuación) en el rango de 3 a 10 μm con un modo de 4.4 μm (Tabla 7). El tamaño de partícula fue ligeramente más bajo que los encontrados para polvos secados por pulverización de betalaínas extraídas de otras fuentes como cactus, amaranto y remolacha. Por lo tanto, Vergara et al. (2014) encontraron un tamaño de micropartícula de 4.6 y 4.7 μm para microcápsulas respectivamente obtenidas de pulpa y cactus ultrafiltrado. En otro estudio con frutos de cactus, los tamaños de las microcápsulas oscilaron entre 6 y 51 μm (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno, y Osorio, 2015). Además, el tamaño de partícula varió de 5 a 40 μm para *amaranthus* betacianinas microencapsuladas (Cai y Corke, 2000) y 11,4-12,8 μm para jugo de remolacha microencapsulado en maltodextrina

(Janiszewska, 2014). Contrariamente a una distribución unimodal encontrada previamente para microcápsulas de betalaína de pulpa y cactus ultrafiltrado (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014), la quinina beta microencapsulada optimizada mostró un modelo de distribución beta (Figura 2C). Se ha demostrado que las temperaturas de secado al aire, alimentan niveles sólidos y el peso molecular de la maltodextrina influyen en el tamaño de micropartículas (Anandharamkrishnan y Padma Ishwarya, 2015; Cai & Corke, 2000; Tonon, Brabet, Pallet, Brat y Hubinger, 2009) y podría explicar las diferencias encontradas en los tamaños de partículas. En condiciones optimizadas de secado por pulverización, todas las microcápsulas de quinoa betacianinas encapsuladas en 10% p / v de maltodextrina 10 DE se deformaron, con arrugas extensas y 399 una superficie mellada (Figura 7A y Figura 7B). Negrão-Murakami et. Alabama. (2017) afirmó que esta morfología ocurre cuando la formación de película es lenta durante el proceso de secado de las gotículas atomizadas. La formación de superficies melladas se ha atribuido a la contracción de partículas durante el proceso de secado, que puede ocurrir a un IAT bajo o alto (Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). Se observó una morfología deformada similar en microcápsulas de pigmentos de cactus con maltodextrina (Saénez, Tapia, Chávez y Robert, 2009) y betalaínas de amaranto también encapsuladas en maltodextrina (Cai y Corke, 2000). Se ha demostrado una mejora en la esfericidad de las partículas cuando una maltodextrina DE 25 se usó como agente transportador para la encapsulación de betacianinas de 408 amaranto (Cai y Corke, 2000). Se ha sugerido que un alto peso molecular del agente de encapsulación 409 podría prevenir la contracción superficial y reducir la presencia de superficies ásperas (Oberoi y Sogi, 2015). Sin embargo, se ha informado una forma deformada en hierba mate secada por pulverización (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) Encapsulada en maltodextrina con DE equivalentes de 10.1, 15 y 20 DE (Negrão-Murakami, et al., 2017) . Por lo tanto, unas interacciones complejas subyacentes entre el núcleo (extracto de betaína) y la pared (maltodextrina) podrían influir en la morfología de las micropartículas obtenidas mediante la tecnología de secado por pulverización

3.3. Estabilidad de almacenamiento acelerada de betacianina de quinua microencapsulada optimizada utilizando un sistema Oxitest

El bajo grado de glicosilación y acilación de betalaína, y temperatura, luz, oxígeno, peróxido de hidrógeno, actividad de agua, humedad relativa, la presencia de enzimas

degradantes como polifenol la oxidasa, la glucosidasa y los iones metálicos se han identificado como factores que influyeron en la estabilidad de la betalaína (Azeredo, 2009; Khan, 2016). Diferentes factores extrínsecos como la temperatura alta, la luz, el oxígeno, el peróxido de hidrógeno y la humedad relativa pueden reducir el contenido de betalaína (Azeredo, 2009; Khan, 2016). La temperatura es el factor más importante que afecta la estabilidad de la betalaína durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Kavitha Ravichandran, et al., 2013), puede producir isomerización, descarboxilación o escisión que produciría una reducción gradual del color rojo, y finalmente apariencia de un color marrón claro en el extracto de betaína (Azeredo, 2009; Fernández-López, Angosto, Giménez y León, 2013). El oxígeno es otro factor extrínseco que afecta la estabilidad de la betaína (Azeredo, 2009). De hecho, la desaparición simultánea de betanina y oxígeno de una solución ha sugerido cinéticas de reacción de segundo orden generales a 68 ° C, que ocurren a un ritmo que sugiere una estequiometría casi uno a uno para la reacción anterior (Attoe & von Elbe, 1984). La temperatura y el oxígeno se han utilizado como factores para el estudio de la estabilidad de la betaína en condiciones de almacenamiento acelerado de ambos líquidos (Cejudo-Bastante, Hurtado, Mosquera, 434 Heredia, 2014; Fernández-López, Angosto, Giménez y León, 2013). ; Güneşer, 2016) y 435 muestras microencapsuladas (Saénz, Tapia, Chávez, y Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014).

Se ha utilizado un horno de aire forzado como sistema convencional para evaluar el comportamiento de las betalaínas microencapsuladas en condiciones aceleradas (Saénz, Tapia, Chávez y Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García y Robert, 2014). Sin embargo, en estos sistemas, los niveles de oxígeno no pueden ser regulados y controlados para la comparación con otros estudios de estabilidad. Además, la degradación de la betalaína no puede controlarse como el consumo de oxígeno (Attoe y von Elbe, 1984).

Según nuestro leal saber y entender, esta es la primera vez que se usa el sistema Oxitest para evaluar la quinina microencapsulada optimizada betacianinas en condiciones aceleradas de temperatura y oxígeno (Figura 8A). Oxitest es un sistema innovador para realizar estudios de estabilidad oxidativa directamente en muestras completas que ha sido diseñado por Velp Scientifica (Velp Scientifica SRL, Italia). Oxitest requiere un reactor de prueba de oxidación para reacciones químicas que se producen entre el oxígeno presurizado y los componentes sensibles del material en bruto a alta temperatura.

El contenido de oxígeno en dos cámaras se controla de forma continua a través de un

sensor de presión como una medida de la oxidación de los componentes de los alimentos. El software OxiSoft™ permite la adquisición en línea de datos de presión y temperatura de oxígeno y la estimación del período de inducción como una medida de estabilidad oxidativa para alimentos sensibles al oxígeno, como aceites o aceites y grasas (www.velp.com). El consumo de oxígeno por la betacianina microencapsulada optimizada se incrementó con la temperatura de calentamiento en el sistema Oxitest. Las pendientes para la reducción de quinua en la presión de oxígeno (medida entre 0-72 h de calentamiento) fueron -4.373×10^{-5} y -6.67×10^{-5} bar min⁻¹ a 80 ° C y 90 ° C, respectivamente (Figura 3B-2 y 3C-2).

Un estudio previo ha demostrado que la degradación de betanina y el consumo de oxígeno se producen a tasas similares [pendiente = 0,96 estimada en por regresión lineal a partir de los datos experimentales informados por Attoe y von Elbe (1984)]; es decir, este significa que la estequiometría para la reacción entre betanina y oxígeno es casi de uno a uno (Attoe & von Elbe, 1984). Por lo tanto, sugerimos que la pendiente del consumo de oxígeno encontrada para la betacianina microencapsulada extraída de la quinua reflejaría la tasa de degradación de la betacianina y podría ser un parámetro rápido y comparable para evaluar la estabilidad de betalain en el producto microencapsulado. Las cotas de consumo de oxígeno a 80 (-4.373×10^{-5} bar min⁻¹) y 90 ° C (-6.67×10^{-5} bar min⁻¹) encontradas en el presente estudio para quinina micro encapsulas fueron más altas que la constante de degradación de betacianina a 60 ° C para betalaínas en pulpa de cactus (1.02×10^{-2} días⁻¹ = 7.36×10^{-6} min⁻¹) y extracto (1.28×10^{-2} días⁻¹ = 8.9×10^{-6} min⁻¹) encapsulado en maltodextrina (Saéñz, Tapia, Chávez y Robert, 2009) y para pulpa de cactus (8.2×10^{-3} días⁻¹ = 5.7×10^{-6} min⁻¹) y ultrafiltrada (7.2×10^{-3} días⁻¹ = 5.7×10^{-6} min⁻¹) producto encapsulado en un almidón modificado (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, y Robert, 2014).

El nivel de oxígeno utilizado en el estado acelerado en el Oxitest (6 bar) y en el horno de aire forzado juntos a la temperatura más alta de Oxitest (80 y 90 ° C frente a 60 ° C) podría explicar las diferencias encontradas entre el consumo de oxígeno y Degradación de betacianina constante de velocidad. Por lo tanto, Oxitest podría ser un sistema rápido en línea para evaluar la estabilidad del pigmento en microencapsulas en condiciones de almacenamiento comparables, controladas y aceleradas. El por encima del consumo de oxígeno produjo la decoloración de las microcápsulas (Figura 8). La distancia euclídea se redujo de $357,3 \pm 1,6$ a $136,1 \pm 3,3$ a 80 ° C (61,9%) y de $337,4 \pm 2,0$ a $116,0 \pm 3,5$ a 90

° C (65,6%) después de 72 h de calentamiento (Figura 8B-1). y Figura 8C-1). Como encontró previamente, la absorbancia a 540 nm -directamente relacionada con el contenido de betacianina- se correlacionó con el color CIELab, de acuerdo con las significativas correlaciones lineales positivas y negativas encontradas entre betalaínas y valores de color en betalaínas de remolacha durante el tratamiento térmico (Güneşer, 2016).

Tabla 6

Diseño compuesto central centrado en la cara para la microencapsulación de betacianina de un extracto de quinoa orgánica de color acuoso. Las propiedades físicas y químicas de las micropartículas se expresan como media \pm SD (n = 3).

Run	Variable Independiente			Parámetros								
	IAT (°C)	AFR (mm)	MD (%)	CIELab color						Humedad (%)	Densidad aparente (g/mL)	Rdto° (%)
				Encapsulado betacyanin ^b	L	a	b	C	h			
1	160	50	30	0.114	91.89 \pm 0.98	11.26 \pm 0.42	-2.96 \pm 0.04	11.65 \pm 0.04	345.27 \pm 0.73	3.13 \pm 0.03	0.47 \pm 0.00	43.01
2	180	60	10	0.391	85.85 \pm 0.19	16.51 \pm 0.11	-2.70 \pm 0.04	16.71 \pm 0.09	350.71 \pm 0.18	8.26 \pm 0.07	0.50 \pm 0.01	19.95
3	140	50	20	0.178	89.14 \pm 0.52	13.70 \pm 0.24	-2.91 \pm 0.02	14.01 \pm 0.24	348.00 \pm 0.19	2.79 \pm 0.06	0.47 \pm 0.01	34.59
4	140	40	30	0.104	89.44 \pm 0.27	13.65 \pm 0.08	-2.99 \pm 0.03	13.97 \pm 0.08	347.67 \pm 0.15	5.56 \pm 0.52	0.53 \pm 0.02	29.82
5	160	50	20	0.181	88.40 \pm 0.25	14.02 \pm 0.45	-2.82 \pm 0.03	14.30 \pm 0.44	348.61 \pm 0.45	3.07 \pm 0.08	0.51 \pm 0.00	37.31
6	140	60	30	0.108	92.86 \pm 0.10	10.44 \pm 0.08	-3.00 \pm 0.02	10.86 \pm 0.08	344.00 \pm 0.05	5.13 \pm 0.32	0.44 \pm 0.00	39.27
7	180	40	10	0.435	83.00 \pm 0.34	19.30 \pm 0.10	-2.50 \pm 0.00	19.46 \pm 0.10	352.61 \pm 0.03	6.31 \pm 0.09	0.50 \pm 0.01	17.97
8	160	50	10	0.482	85.23 \pm 0.09	17.09 \pm 0.06	-3.02 \pm 0.03	17.36 \pm 0.06	349.94 \pm 0.08	5.79 \pm 0.50	0.41 \pm 0.00	21.36
9	160	60	20	0.209	89.92 \pm 0.24	12.83 \pm 0.12	-2.81 \pm 0.03	13.13 \pm 0.11	347.64 \pm 0.22	2.67 \pm 0.01	0.42 \pm 0.02	36.93
10	180	60	30	0.105	92.72 \pm 0.38	10.81 \pm 0.34	-2.99 \pm 0.01	11.21 \pm 0.33	344.56 \pm 0.51	7.96 \pm 0.01	0.46 \pm 0.00	42.68
11	160	50	20	0.185	88.97 \pm 0.07	13.22 \pm 0.08	-2.73 \pm 0.02	13.50 \pm 0.08	348.31 \pm 0.05	3.43 \pm 0.14	0.47 \pm 0.00	35.92
12	160	50	20	0.185	88.55 \pm 0.22	13.54 \pm 0.13	-2.86 \pm 0.01	13.83 \pm 0.12	348.08 \pm 0.10	3.92 \pm 0.15	0.44 \pm 0.01	35.26
13	160	40	20	0.193	88.25 \pm 0.67	14.92 \pm 0.24	-2.86 \pm 0.06	15.19 \pm 0.23	349.14 \pm 0.37	4.02 \pm 0.01	0.47 \pm 0.00	31.98
14	160	50	20	0.194	87.36 \pm 0.00	13.44 \pm 0.00	-2.96 \pm 0.00	15.57 \pm 0.00	350.21 \pm 0.00	3.43 \pm 0.14	0.47 \pm 0.00	36.40
15	180	50	20	0.189	87.25 \pm 0.22	15.46 \pm 0.14	-2.64 \pm 0.02	15.68 \pm 0.13	350.32 \pm 0.15	4.37 \pm 0.26	0.55 \pm 0.01	31.41
16	160	50	20	0.198	88.98 \pm 0.08	13.60 \pm 0.05	-2.86 \pm 0.02	13.89 \pm 0.05	348.13 \pm 0.08	2.14 \pm 0.17	0.45 \pm 0.01	35.22
17	160	50	20	0.186	88.36 \pm 0.25	13.72 \pm 0.10	-2.88 \pm 0.01	14.04 \pm 0.10	348.17 \pm 0.08	2.21 \pm 0.04	0.44 \pm 0.00	36.34
18	180	40	30	0.107	90.23 \pm 0.10	13.08 \pm 0.21	-2.86 \pm 0.01	13.38 \pm 0.21	347.65 \pm 0.21	3.07 \pm 0.06	0.47 \pm 0.01	36.93
19	140	60	10	0.413	86.16 \pm 0.12	16.21 \pm 0.02	-3.11 \pm 0.02	16.51 \pm 0.02	349.13 \pm 0.10	4.14 \pm 0.26	0.48 \pm 0.01	20.96
20	140	40	10	0.379	84.13 \pm 0.02	18.77 \pm 0.09	-3.03 \pm 0.01	19.01 \pm 0.09	350.83 \pm 0.06	3.16 \pm 0.04	0.53 \pm 0.02	17.66

a Altura indicada para el rotámetro de la secadora por pulverización.

b Media de absorbancia a 540 nm (n = 3). En todos los casos, el RSD% estaba por debajo del 8%.

c Calculado a partir del peso del producto recogido y el peso (g) de la masa no disolvente en la alimentación. Se usaron cien gramos de solución acuosa que contenía extracto acuoso de betacianina y maltodextrina.

Tabla 7

Características químicas y físicas de la betacianina de quinua orgánica coloreada microencapsulado por condiciones optimizadas de secado por pulverización. Los valores se expresan como media \pm SD ($n = 3$), excepto por el tamaño de partícula que se expresa como modo.

Parameters	
Microencapsulates	
Water activity	0.127 ± 0.006
Moisture (%)	1.64 ± 0.08
CIELab color	
L	81.96 ± 0.44
a	17.09 ± 0.09
b	-3.10 ± 0.05
C	17.37 ± 0.10
h	349.64 ± 0.15
Dissolution (s)	348.50 ± 2.12
Particle size ^c	
Mode (μm)	4.4
Asymmetry (μm)	1.1
Betacyanin content (mg/100 g) ^a	19.95 ± 0.17
Saponin content (mg/100 g) ^b	< 8
Spray-drying process	
Yield (%) ^d	58.1

a Calculado a partir de la absorbancia a 540 nm y utilizando un peso molecular = 550.46 y un coeficiente de extinción molar de 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹.

b Altura de la espuma igual a 0.88 ± 0.04 mm. Este contenido de saponina corresponde a la muestra dulce de quinua dulce (Koziol, 1991).

c Trescientos cincuenta micropartículas se contaron manualmente utilizando ImageJ. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de distribución beta por EasyFit Software (MathWave Technologies, EE. UU.). Los parámetros del modelo beta se usaron para estimar el modo y la asimetría de las micropartículas.

d Calculado a partir de una solución de alimentación en peso = 770 g que contiene 77 g de maltodextrina.

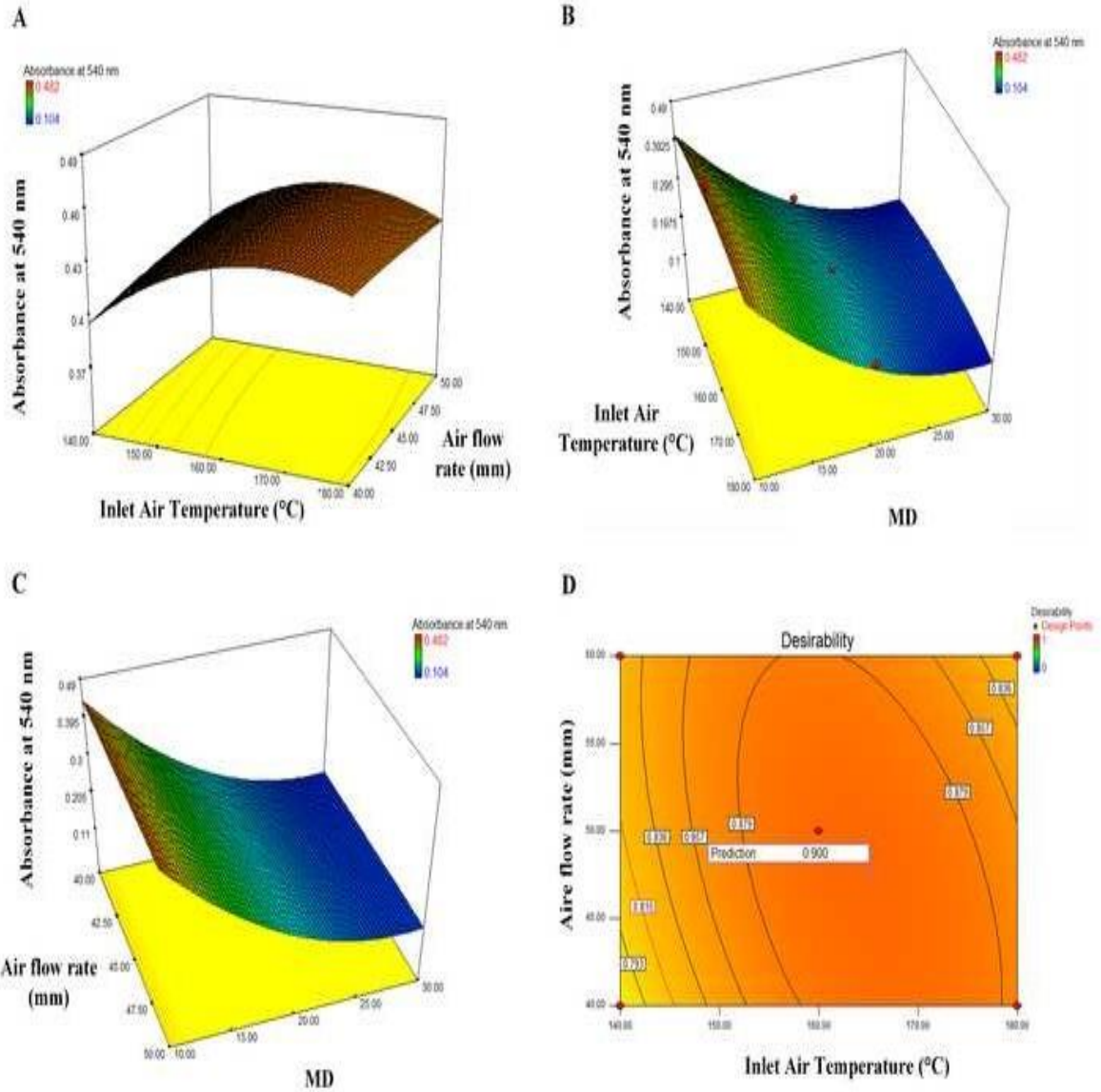


Figura 6 Superficie de respuesta y diagrama de contorno del efecto de las condiciones de secado por aspersión que incluyen temperatura del aire de entrada, tasa de flujo de aire y concentración de maltodextrina (10 DE) en la absorbancia a 540 nm como medida de betacianina microencapsulada (A, B y C). Optimizado la región del contorno de secado por pulverización para la temperatura del aire de entrada y la velocidad del flujo de aire se identificaron con una deseabilidad de 0.9 (C).

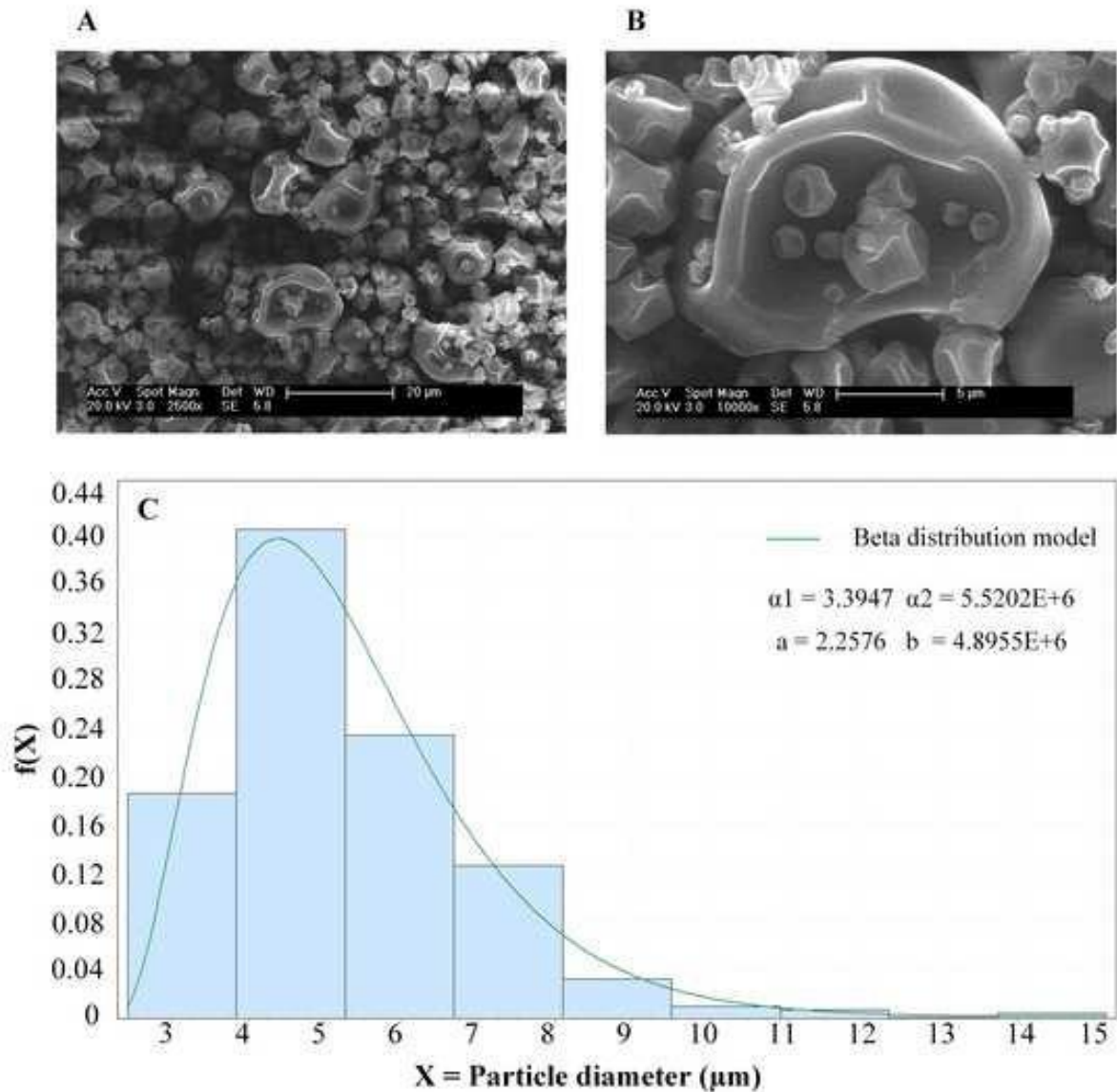


Figura 7 Imagen de microscopía electrónica de barrido de betacianina de quinua microencapsulada extraída en agua, encapsulada por secado por pulverización (A-B). Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas se ajustó a un modelo beta usando EasyFit Software (C). Secado por aspersión llevado a cabo en condiciones óptimas (temperatura del aire de entrada = 165 ° C, flujo de aire = 47 mm y 10% w / v de maltodextrina 10 DE), que se establecieron por metodología de superficie de respuesta con un diseño compuesto central centrado en la cara.

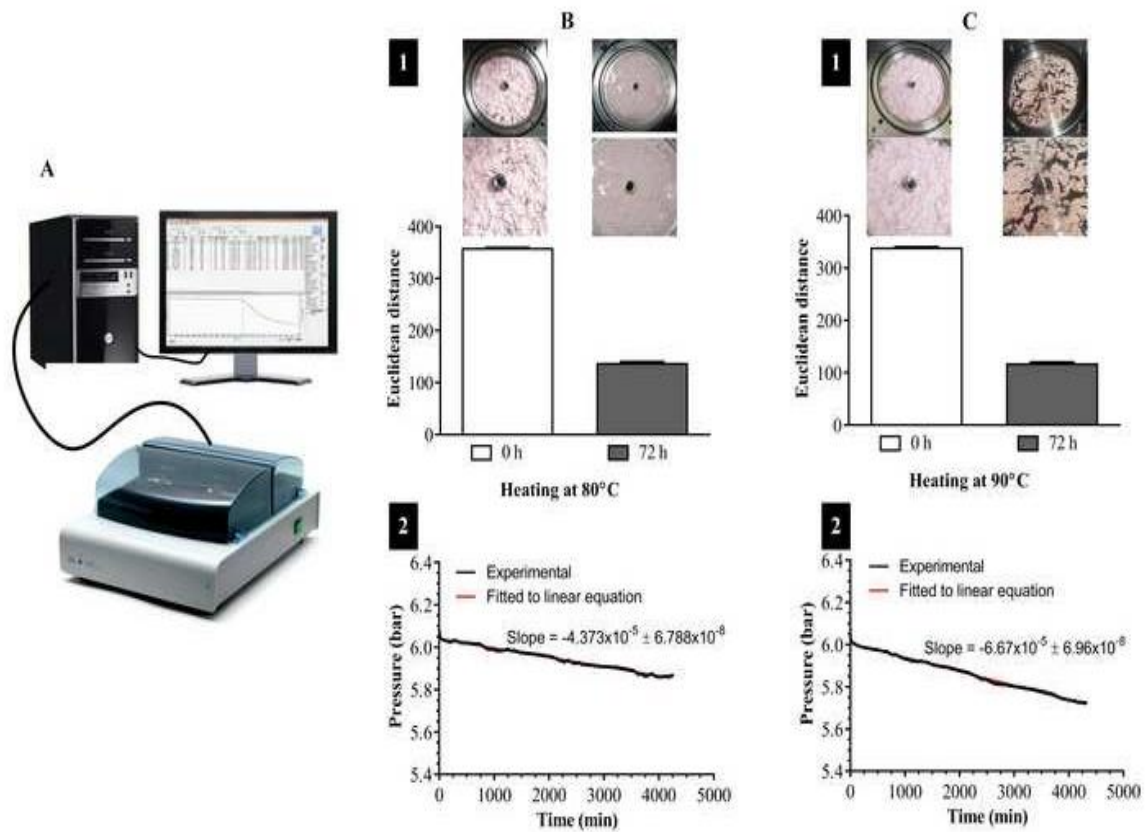


Figura 8 Estabilidad de betacianinas microencapsuladas optimizadas de maltodextrina de quinua de color betalaína orgánica en condiciones aceleradas usando un sistema Oxitest (A). Oxígeno el consumo se controló a 80 ° C y 90 ° C y se estimó como pendiente por regresión lineal análisis (B-1 y C-1). La degradación de Betacianina se calculó como la distancia Euclidiana antes y después de calentar. Los valores RGB y HSV se midieron con la aplicación gratuita de Android "ON Color Mida" y se usa para calcular la distancia euclidiana. Los valores son media \pm SD de mediciones triplicadas.

CONCLUSIONES

- La extracción asistida por ultrasonido óptima de betalaínas de cáscaras de quinua coloreada se puede llevar a cabo en agua a tiempos de procesamiento muy cortos de 9,2 o 40 s para muestras que contienen betacianinas y betaxantinas, respectivamente.
- Los extractos preparados por ultrasonido son incluso más estables que los extraídos de las remolachas y contienen una baja concentración de saponinas.
- Las cáscaras de quinua son un subproducto que es una buena fuente de betalaínas y saponinas, y podrían ser un ingrediente bifuncional único para las industrias alimentarias y /o farmacéuticas.
- Este estudio optimizó la microencapsulación de betacianina en maltodextrina extraída de quinua negra por secado por pulverización. Dos compuestos bioactivos, betacianina y saponina, fueron encontrados en las microencapsulas optimizadas. La estabilidad de la betacianina microencapsulada puede ser evaluada por el consumo de oxígeno usando el sistema Oxitest.

REFERENCIAS

- Abderrahim, F., Huanatico, E., Segura, R., Arribas, S., González, M.C., Condezo-Hoyos, L. (2015). Physical features phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa Willd.*) from Peruvian Altiplano. *Food Chem*, (183), pp. 83–90.
- Abderrahim, M.M., Arribas, S., Condezo-Hoyos, L. (2016). A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods. *Talanta*, (152), pp. 82–89.
- Azeredo, H.M.C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability –a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* (44), pp. 2365–2376.
- Cardoso-Ugarte, G.A., Sosa-Morales, M.E., Ballard, T., Liceaga, A., San Martín-González, M.F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT – Food Sci. Technol*, (59), pp. 276–282.
- Celli, G.B., Brooks, M.S.-L. (2017). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — a current review. *Food Res. Int*, (100), pp.501–509.
- Chandran, J., Nisha, P., Singhal, R.S., Pandit, A.B. (2014). Degradation of colour in beetroot (*Beta vulgaris L.*): a kinetics study. *J. Food Sci. Technol.* (51), pp.2678–2684.
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Allaf, T., Vorobiev, E., (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends Anal. Chem.* (71), pp.157–168.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* (34), pp. 540–560.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez, O., (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (40), pp. 173–289.
- Escribano, J., Cabanes, J., Jiménez-Atiénzar, M., Ibañez-Tremolada, M., Gómez-Pando, L.R., García-Carmona, F., Gandía-Herrero, F. (2017). Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. *Food Chem.* (234), pp. 285–294.

- Fernandez-Lopez, J.A., Angosto, J.M., Gimenez, P.J., Leon, G. (2013). Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum.* (68), 11–17.
- Güneşer, O., 2016. Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment. *Food Chem.* (196), pp. 220–227.
- Gengatharan, A., Dykes, G.A., Choo, W.S., (2015). Betalains: natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT – Food Sci. Technol.* (64), pp. 645–649.
- Hammi, K.M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., Ksouri, R. (2015). Optimization of ultrasound- assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian Zizyphus Lotus fruits using response surface methodology. *Food Chem.* (184), pp. 80–89.
- Kentish, S., Ashokkum, M., (2011). The physical and chemical effects of ultrasound. In: Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, New York, pp. 1–12.
- Khan, M.I., (2016). Stabilization of betalains: a review. *Food Chem.* (Part B), pp. 1280–1285.
- Koubaa, M., Francisco, J., Barba, F.J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Nadia
- Boussetta, N., Vorobiev, E. (2016). Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* (37), pp. 336–344.
- Koziol, M.J., 1991. Afrosimetric estimation of threshold saponins concentration for bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). *J. Sci. Food Agric.* (54), pp. 211–219.
- Kuljanabagavad, T., Thongphasuk, P., Chamulitrat, W., Wink, M., (2008). Triterpene saponins from *chenopodium quinoa willd*. *Phytochemistry* (69), pp. 1919–1926.
- Loginova, K.V., Lebovka, N.I., Vorobiev, E., (2011). Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *J. Food Eng.* (106), pp. 127–133.
- Maran, J.P., Priya, B., (2015). Natural pigments extraction from *Basella rubra* L: fruits by ultrasound-assisted extraction combined with box-Behnken response surface design. *Sep. Sci. Technol.* (50), pp. 1532–1540.

- Maran, J.P., Priya, B., (2016). Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound- assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. *J. Food Sci. Technol.* (53), pp. 792–799.
- Maran, J.P., Manikandan, S., Mekala, V., (2013). Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box–Behnken design with desirability function. *Ind Crops Prod.* (49), pp. 304–311.
- Otálora, M.C., Carriazo, J.G., Iturriaga, L., Nazareno, M.A., Osorio, C., (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chem.* (187), pp.174–181.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G.G., McHugh, T.H., 2012. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrason. Sonochem.* (19), pp. 365–372.
- Ramli, N.S., Ismail, P., Rahmat, A., (2014). Influence of conventional and ultrasonic-assisted extraction on phenolic contents, betacyanin contents, and antioxidant capacity of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Sci. World J.*2014, 964731.
- Roriz, C.L., Barros, L., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., (2017). Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Ind. Crops Prod.* (105), pp. 29–40.
- Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M.R., San Martin-Martinez, E., Zepeda, L.G., (2013). Extraction stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. Using response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* (61), pp. 11995–12004.
- Sivakumar, V., Anna, J.L., Vijayeeswarri, J., Swaminathan, G., (2009). Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing leather. *Ultrason. Sonochem.* (16), pp. 782–789.
- Sorouraddin, M.-H., Saadati, M., Mirabi, F., (2015). Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. *J. Food Drug Anal.* (23), pp. 447–452.
- Tang, Y., Li, X., Zhang, B., Chen, P.X., Liu, R., Tsao, R. (2015). Characterisation of phenolics: betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. *Food Chem.* (166), pp. 380–388.

- Tsai, P.J., Sheu, C.H., Wu, P.H., Sun, Y.F. (2010). Thermal and pH stability of betacyanin pigment of Djulis (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and their relation to antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* (58), pp. 1020–1025.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., Martinez, E.A., (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*): an ancient Andean grain: a review. *J. Sci. Food Agric.* (90), pp. 2541–2547.
- Vilcacundo, R., Hernández-Ledesma, B., (2017). Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Curr. Opin. Food Sci.* (14), pp. 1–6.

ANEXOS

ANEXO 01: GALERÍA FOTOGRÁFICA



Figura I. Equipo de ultrasonido de laboratorio UP 100H

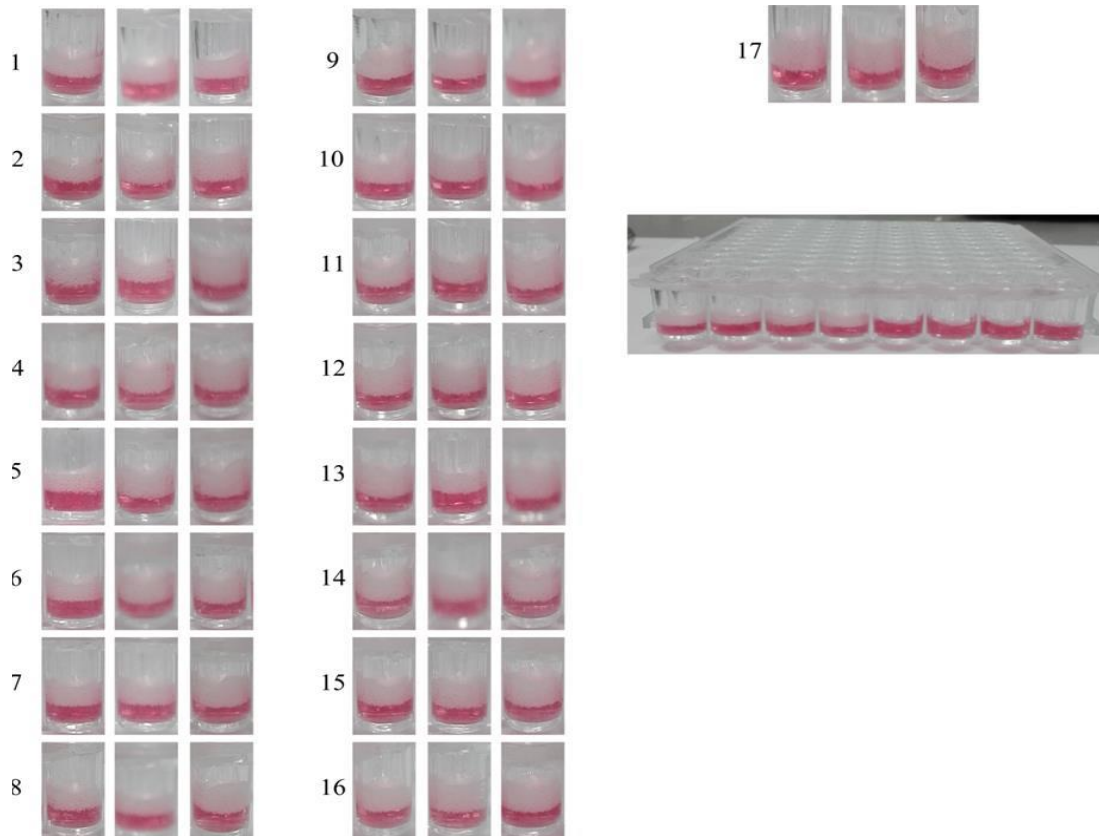


Figura II. Imagen del método afrosimétrico de la muestra M1 adaptado a micro-volúmenes de extracto

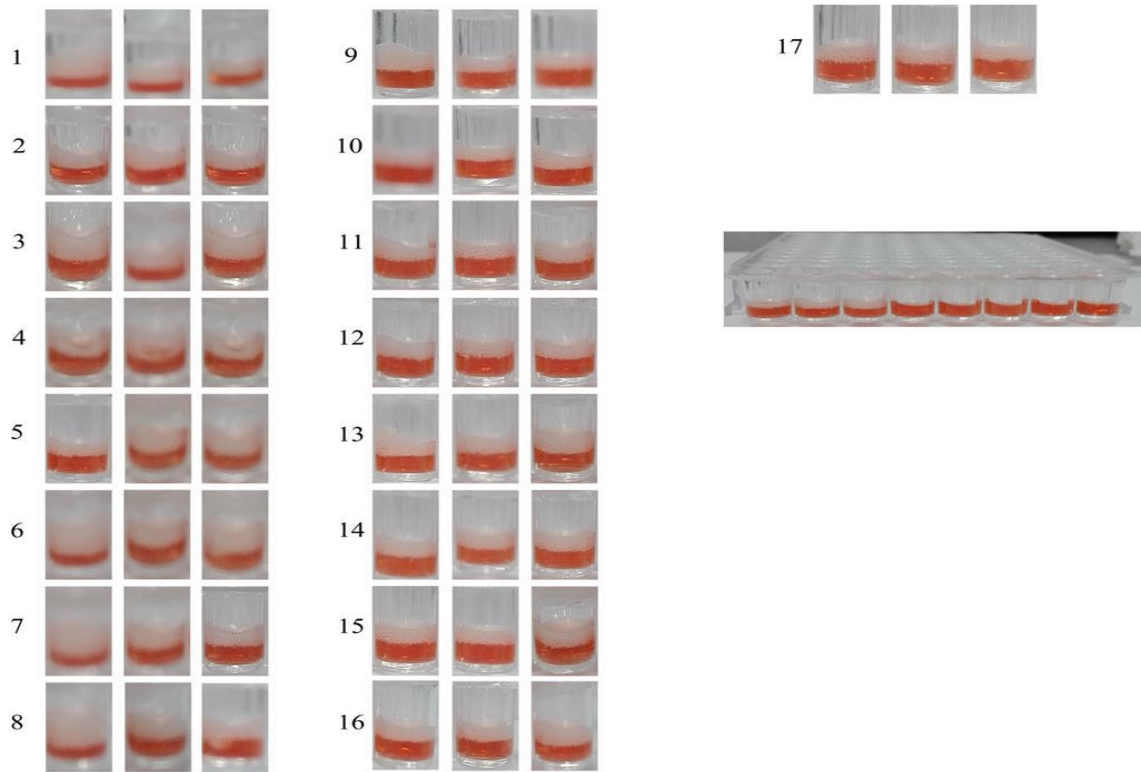


Figura III. Imagen del método afrosimétrico de la muestra M13 adaptado a micro-volumenes de extracto.

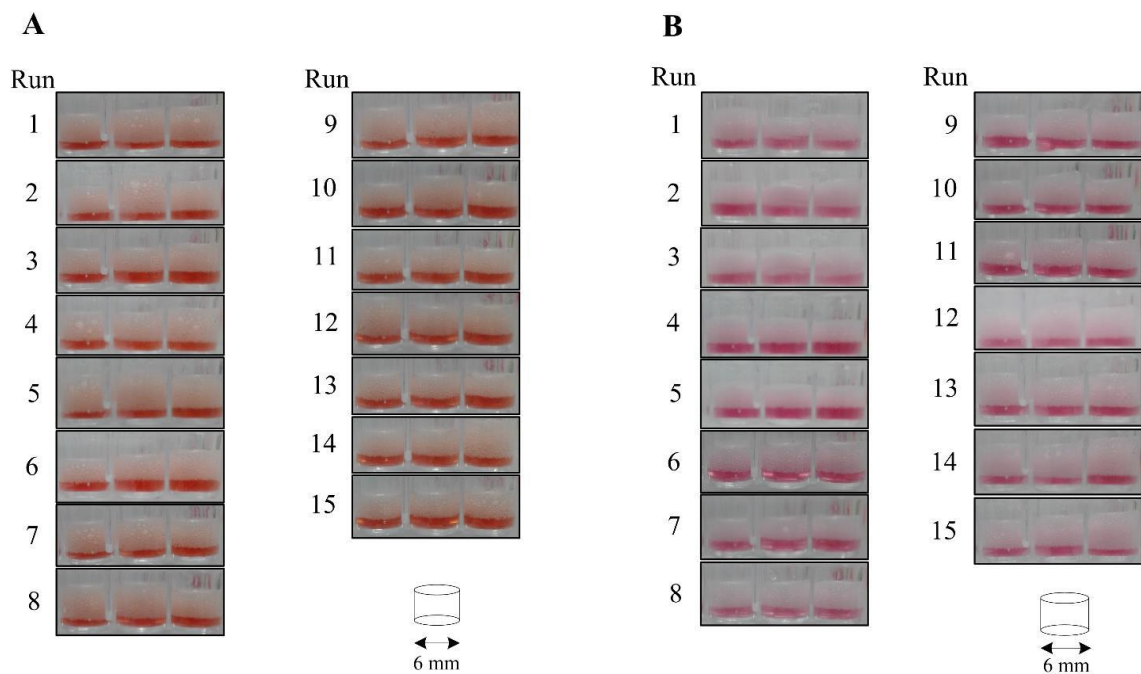


Figura IV Imagen del método afrosimétrico de los extractos de las muestras de quinua M13 (A) y M1 (B) preparados mediante ultrasonido según el diseño de superficie de respuesta.



Figura V. Sistema de atomización empleado en el microencapsulamiento de betalaínas de quinua en maltodextrina

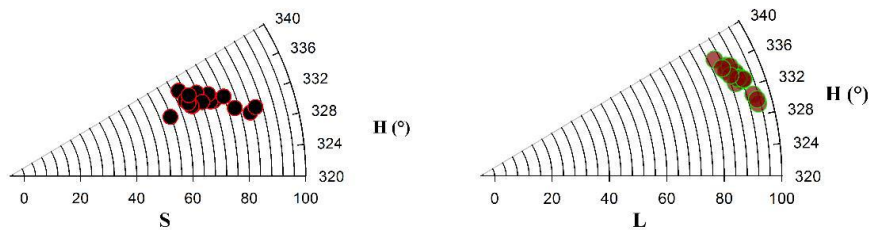
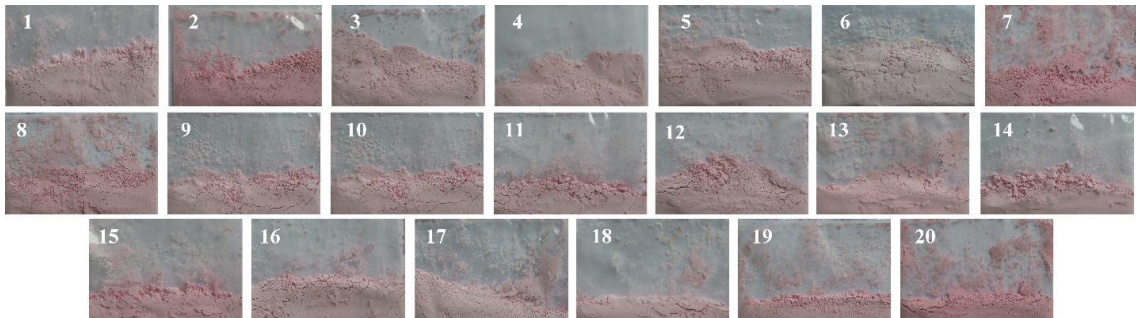


Figura VI. Color de los microencapsulados de betalaínas de quinua preparados por atomización

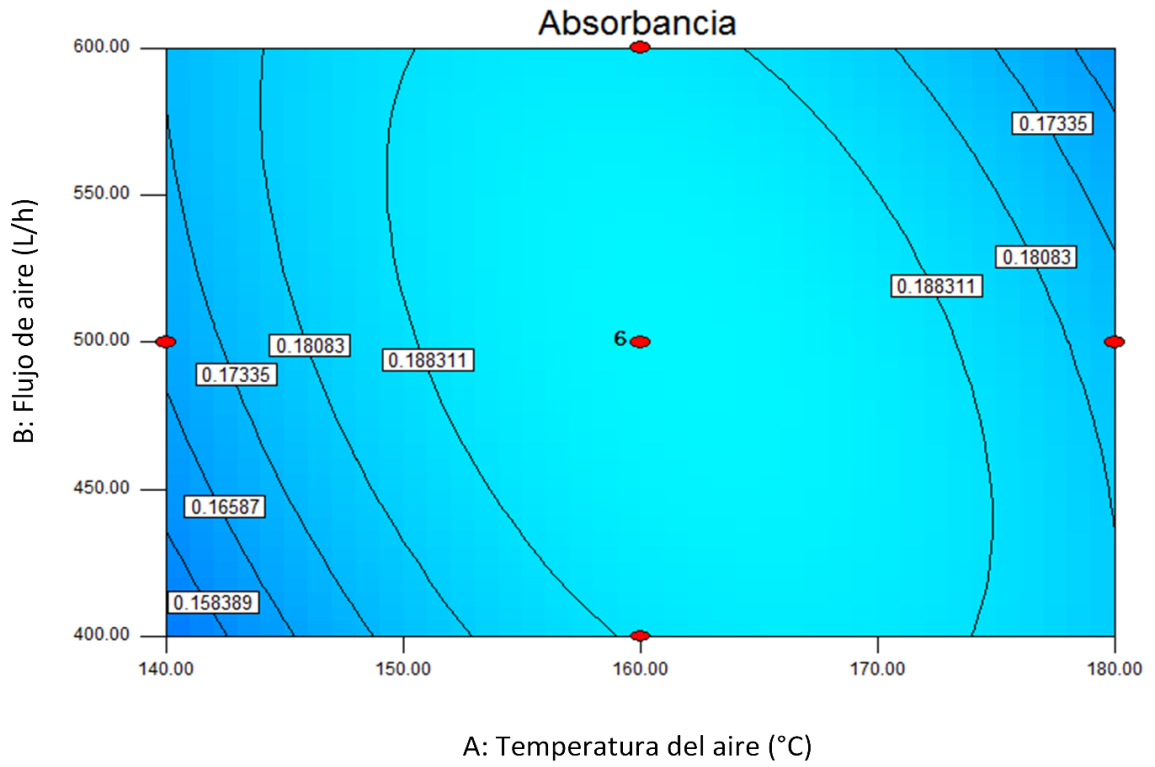


Figura VII. Ploteo de contornos del modelo polinomial de segundo grado ($R^2 = 0.9855$) de ajuste de los datos experimentales de absorbancia de los microencapsulados.

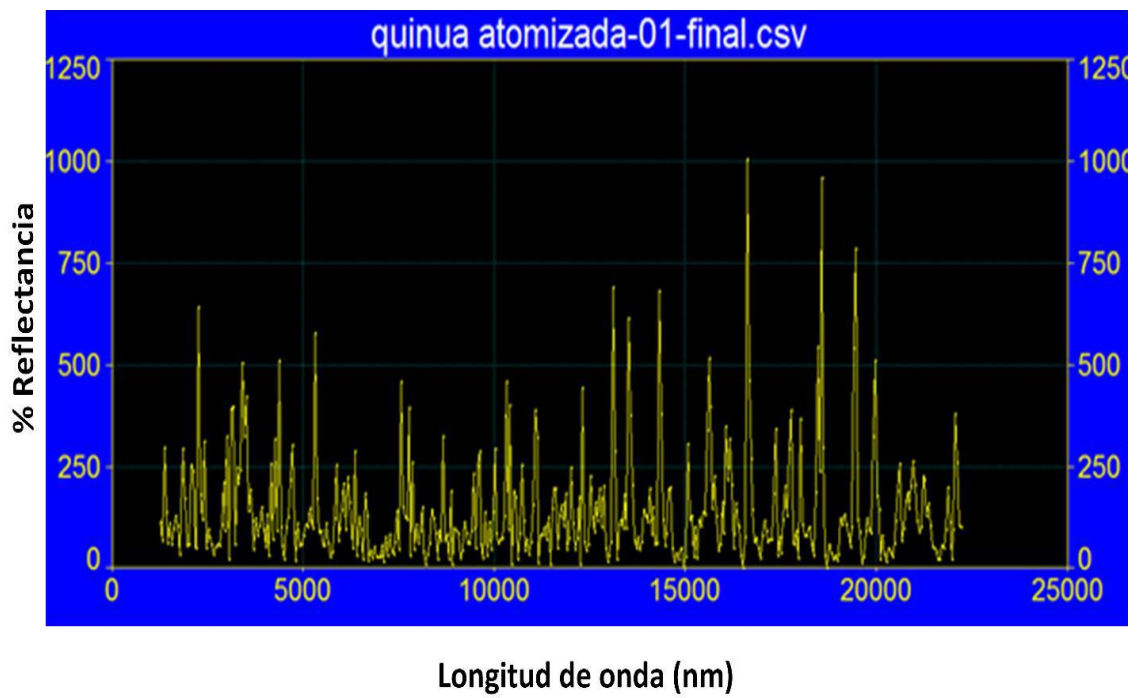


Figura VIII. Espectro FT-IR del microencapsulado de betalaínas de quinua óptima.



Figura IX. Microscopio de barrido electrónico Philips XL30 S-FEG



Figura X. Sistema de recubrimiento con metales Q150T-S para el análisis por microscopía de barrido electrónico



Figura XI. Sistema Oxitest para estudio de estabilidad del micro-encapsulado de betalaínas optimizado

ANEXO 02: Documento que acredita la aceptación y publicación del artículo. Link para el acceso.

<https://authors.elsevier.com/tracking/article/details.do?aid=9981&jid=INDCRO&surname=Condezo-hoyos>

09/12/2017

Track Your Article

Toggle navigation

ELSEVIER

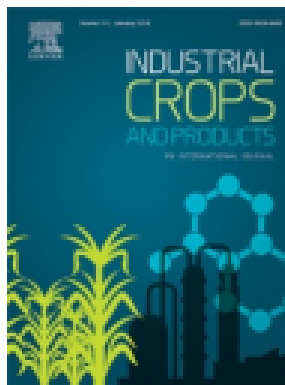
- [Log In](#)
- [Register](#)
- [Help](#)

—

- [Edit Details](#)
- [Change Password](#)
- [Logout](#)

Track Your Accepted Article

The easiest way to check the publication status of your accepted article



ISSN 0926-6690

Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) hulls

Article reference

INDCRO9981

Journal

Industrial Crops & Products

Corresponding author

Luis Condezo-hoyos

First author

Cesar Laqui-Vilca

Received at Editorial Office

25 May 2017

Article revised

16 Nov 2017

Article accepted for publication

17 Nov 2017

DOI

[10.1016/j.indcrop.2017.11.034](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.034)

Last update: 22 Nov 2017

[Share via email](#)

Bibliographic information

Volume/Issue

111C

Full bibliographic details

Industrial Crops & Products 111C (2018) pp. 606-614

Final article available online

11 Dec 2017

[View your final article](#)

[Cited by in Scopus: 0](#)

[Get your Stats on Mendeley](#)

[Track another article](#)

**Now also available
to Authors**

- ✓ Printed copies of the journal issue
- ✓ Customized posters
- ✓ Publication certificate

Find more offers

ELSEVIER'S WebShop

Status comment

- The final version of your article is published online.

Production events

Date	Event	Help
22 Nov 2017	The Share Link has been sent to you	
22 Nov 2017	Final version of your article published online	
22 Nov 2017	Your proof corrections have been returned to Elsevier	
20 Nov 2017	Proofs available for checking	
19 Nov 2017	Rights & Access form completed by you	
19 Nov 2017	Colour order form completed by you	
19 Nov 2017	Offprint order form completed by you	
17 Nov 2017	Rights & Access form sent to you for completion	
17 Nov 2017	Colour order form sent to you for completion	
17 Nov 2017	Offprint order letter sent to you for completion	
17 Nov 2017	Received for production	

Complimentary items

- You are entitled to a Share Link for your article free of charge. The Share Link will be sent you as soon as the final article is published in an issue.

[Track another article](#)

Track your accepted article

Our reference:

Author surname:

Please use the corresponding author.

Copyright © 2017 Elsevier, except certain content provided by third parties. [Terms and Conditions](#) [Privacy Policy](#) [Contact Us](#)

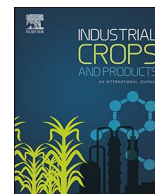
Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.

 RELX Group™

ANEXO 3:

Artículo Publicado: La extracción óptima asistida por ultrasonido y la estabilidad térmica de las betalaínas de las cáscaras de quinua coloreada (*Chenopodium quinoa Willd*).

ANEXO 4: Manuscrito "Microencapsulación de betacianina de quinoa orgánica (*Chenopodium quinoa Willd*) y estabilidad de almacenamiento acelerada usando un sistema Oxitest".



Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) hulls



Cesar Laqui-Vilca^a, Silvana Aguilar-Tuesta^a, Wile Mamani-Navarro^a, Jose Montaña-Bustamante^a, Luis Condezo-Hoyos^{b,*}

^a Universidad Nacional de Juliaca, Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Juliaca, Peru

^b Scientific Analyst & Consultant, Lima, Peru

ARTICLE INFO

Keywords:

Betalains
Quinoa hulls
Ultrasound-assisted extraction
Response surface methodology
Thermal stability

ABSTRACT

Ultrasound-assisted extraction in water of betalains from selected colored quinoa hulls with specific colors was optimized by response surface methodology using a Box-Behnken design and then the thermal stability of these betalains was evaluated. Betacyanins from quinoa hulls were optimally extracted at amplitude = 70%, cycle = 0.6 and very short extraction time = 9.2 s, which produced 96.477 mg of betalains/100 g fresh weight of sample (FW). For quinoa hulls containing betaxanthins, an amplitude = 90%; cycle = 0.7 and extraction time = 40 s was required for the optimal extraction of pigments (201.01 mg of betalains/100 g FW). Total content of saponins between 0.69 and 1.14 mg/g FW, and 0.51 and 0.62 mg/g FW were found in the extract of betacyanins and betaxanthins, respectively. Conventional extraction of betalains from quinoa hulls required 30 min at room temperature to reach similar yields. The thermal stability kinetic parameters at 90 °C (first-rate rate constant, $k = 0.068 \text{ min}^{-1}$ and half-time, $t_{1/2} = 10.2 \text{ min}$) for betacyanins extracted from quinoa hulls were comparable to those measured for beetroot betalains whereas betaxanthin extracted from quinoa hulls was more thermostable with a $k = 0.019 \text{ min}^{-1}$ and $t_{1/2} = 37 \text{ min}$. Quinoa hulls are a good source of betalains and the presence of saponins in the extracts could help produce a unique bifunctional ingredient for the food and/or pharmaceutical industries.

1. Introduction

Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) is a pseudo-cereal from the Andean region in South America that has been recognized as an extremely nutritious grain all over the world (Vega-Galvez et al., 2010; Vilcacundo and Hernández-Ledesma, 2017). Recently, colored quinoa cultivars have been demonstrated to be a good source of phenolics, flavonols and betalains – mainly contained in the quinoa hulls (Abderrahim et al., 2015; Escribano et al., 2017; Tang et al., 2015). Betalains are presently gaining popularity as pigments for use as natural colorants and/or bioactive compounds due to their anti-oxidant, anti-cancer, anti-lipidemic and anti-microbial activities (Gengatharan et al., 2015) and, therefore, novel plant sources are valuable and interesting for the functional food and pharmaceutical industries.

Conventional solid-liquid procedures, like maceration and soxhlet are commonly used to extract betalains from plant sources (Celli and Brooks, 2017; Ramli et al., 2014). Thus, an optimal extraction of betalains from *Opuntia jonocostle* c.v. has been obtained using methanol-aqueous medium (20:80 v/v) for 10 min at 15 °C (Sanchez-Gonzalez

et al., 2013). In another study, the maceration extraction of betalains from *Opuntia ficus-indica* was optimum at 42 °C for 115 min (Maran et al., 2013). The green extraction processes have been recently developed as alternative procedures for extraction of betalains including ultrasound (Ramli et al., 2014), microwave (Cardoso-Ugarte et al., 2014) or pulsed electric fields (Loginova et al., 2011), their use can reduce extraction time, solvent-energy consumption and post-treatment waste-water compared to conventional procedures (Chemat et al., 2015; Chemat et al., 2017). Ultrasound-assisted extraction (UAE) have been developed to extract betalains from beetroot (Sivakumar et al., 2009), Malabar spinach (Maran and Priya, 2015), red beet stalks (Maran and Priya, 2016) and red dragoon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) (Ramli et al., 2014). However, the optimal conditions for UAE can be dependent on the matrix composition and chemical nature of betalains so extraction conditions should be established for each plant source. UAE could be an efficient green process to extract betalains from colored quinoa hulls but optimal conditions should be evaluated.

Betalains are not widely used in the food industry due to their poor processing and storage stability (Celli and Brooks, 2017; Delgado-

* Corresponding author.

E-mail addresses: lcondeztom@hotmail.com, lcondezo@s-analyst.com (L. Condezo-Hoyos).

Vargas et al., 2000). Intrinsic factors like high temperature, light and oxygen pressure have been reported to reduce the stability of betalains (Khan, 2016). Moreover, the degree of glycosylation or acylation of the betalains can also influence their stability (Khan, 2016). The chemical nature of betalains can change depending on the plant source from which they were extracted (Khan, 2016). Unlike other betalain sources, colored quinoa contains significant amounts of amaranthin (121.9–148.6 mg/kg), isoamaranthin (108.3–145.5 mg/kg), and dopaxanthin (35.9–85.3 mg/kg) (Escribano et al., 2017). Therefore, the thermal stability of betalains extracted from colored quinoa hulls deserve evaluation.

Our aims here were: 1) select colored quinoa hulls in function of their profiles of betalains as shown by color properties and absorption spectrum, 2) optimize UAE of betalains from selected colored quinoa hulls using a response surface methodology, and 3) evaluate the thermal stability of the betalains extracted by the ultrasound under cooking conditions.

2. Materials and methods

2.1. Quinoa seeds

Seeds of five different colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) were selected and harvested in March 2016 from the Peruvian Altiplano region. The colored quinoa was selected on the basis of its maximal tonal diversity to reflect different profiles of betalains (Abderrahim et al., 2015). The common names of the selected quinoa samples were: M₁ = Red Pasankalla, M₂ = Pink Pasankalla, M₅ = Red Chullpi, M₇ = Pink Capachica and M₁₃ = Bright red Pasankalla (Fig. 1A). MilliQ ultrapure grade water (< 18.2 mΩ) was used for extraction of betalains.

2.2. Scarification of quinoa seeds

A by-product of quinoa processing, the hulls of the seeds are rich in betalains and saponins. Saponins are bitter compounds that are removed from the seed by scarification. In the present study, 10 g of quinoa seeds were scarified by manual scratching on mesh No 35 for 10 min at room temperature. The amount of collected hulls ranged from

0.33 to 0.40 g (3.3–4.0% w/w), which were immediately packed in sealed containers and stored at –20 °C until analysis.

2.3. Color properties and content of betalains of quinoa hull

2.3.1. Color properties

Quinoa seeds and hull images were simultaneously acquired with an HP PSC 1510 scanner (HP, NY, USA) at maximum resolution within an adapted black box to avoid exposing the samples to external light and maintain the best image quality. Red (R), green (G) and blue (B) histograms were obtained by image analyses using the color histogram tool in the Fiji ImageJ software (National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA). A KLT/PCA color space and Median Cut display mode from the Fiji ImageJ Color Inspector 3D Plugin were also used. The absorption spectrum was measured as in Section 2.3.1 to classify colored quinoa samples.

2.3.2. Quantification of betalains

Fifty micrograms of quinoa hull samples were extracted with 500 μL of water under shaking at maximum speed for 30 min at room temperature. The aqueous extract was centrifuged at 12000 × g for 5 min at 4 °C. Supernatant (100 μL) was transferred to a 96-well plate and the absorption spectrum was acquired between 400 and 700 nm every 5 nm in a Synergy HT multi-mode microplate reader (Biotek, Rochester, VT, USA).

Total content of betalains was assessed as the sum of betacyanins and betaxanthins by microplate reader spectrophotometric procedure (Abderrahim et al., 2015). A residual procedure was used for peak separation and analysis (betacyanins and betaxanthins) employing a linear baseline, Savitsky-Golay filter for smoothing and Gauss peak type model from PeakFit v.4.12 software (Systat Software, Inc., USA). Betacyanins (MW = 550.46 g/mol) and betaxanthins (MW = 538.35 g/mol) were quantified from their estimated absorbance after peak separation using molar extinction coefficients of 60,000 and 48,000 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectively. The pathlength was calculated from sample volume and well-diameter in the 96-well plate.

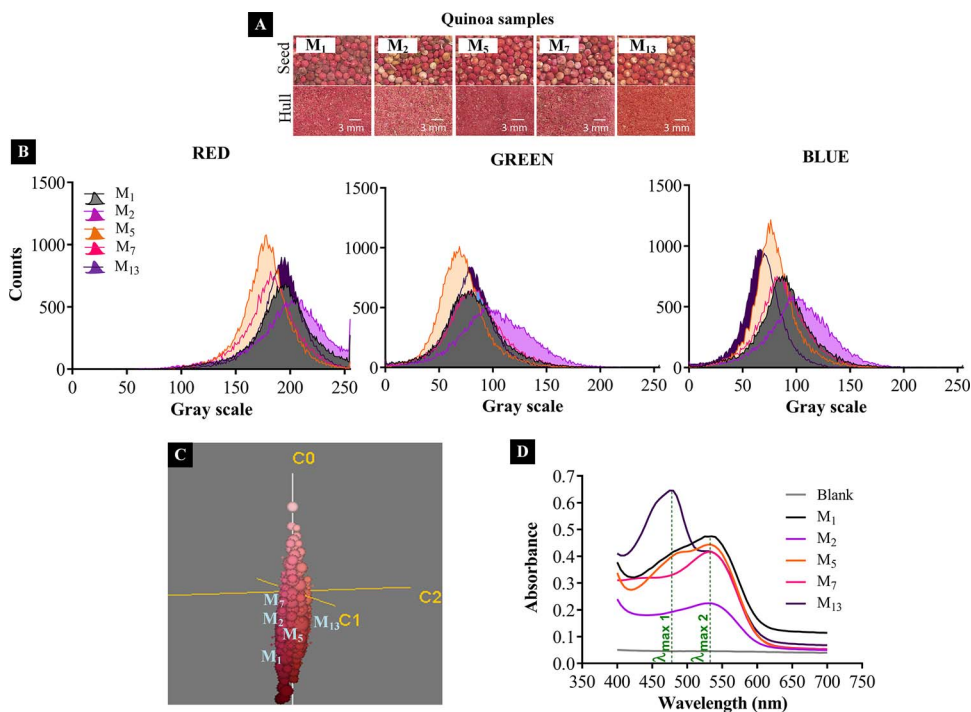


Fig. 1. Image of colored quinoa seeds and hulls (A). RGB values obtained from 25 images by histogram color analysis (B) and KLT/PCA space color plot (C). Absorption spectrum of an aqueous extract (blank = water) measured in a microplate reader from 400 to 700 nm (mean from triplicated measurements). Common names of the samples are: M₁ = Red Pasankalla, M₂ = Pink Pasankalla, M₅ = Red Chullpi, M₇ = Pink Capachica and M₁₃ = Bright Red Pasankalla. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2.4. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of betalains from quinoa hulls using response surface methodology

2.4.1. Ultrasound equipment

A compact ultrasonic laboratory device UP 100H (Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Germany) of 100W and 30 kHz was used to extract betalains from two selected quinoa hull samples. An MS 0.5 standard sonotrode (0.5 mm tip diameter, 140 μm maximum amplitude and 125 W/cm² acoustic power density) was employed to carry out the extraction of betalains. This equipment can adjust the output power by regulating the percentage of amplitude (20–100%). In addition, the UP100H can also operate in pulse control mode for temperature-sensitive samples. A pulse control set to 1 means that ultrasound equipment is continuously operated and a value of 0.6 indicates the power is discharged for 0.6 s with a pause of 0.4 s.

2.4.2. Experimental design

Ultrasound-assisted extraction of betalains was carried out in tubes at a 1:100 ratio of quinoa hull to water, which were selected by image analysis. The ultrasound extraction from selected quinoa hulls were optimized by a response surface methodology (RSM) using a Box-Behnken design (number of center points = 3). Amplitude (X_1), cycle (X_2) and extraction time (X_3) were included as independent variables (Table 1) and the total content of betalains (Y) as a dependent variable (Tables 2 and 3). The following independent variable values were employed: for sample M_1 , X_1 from 60 to 90; X_2 from 0.2 to 0.6 and X_3 from 2 to 20 s and, for sample M_{13} , X_1 from 50 to 90; X_2 from 0.6 to 1.0 and X_3 from 10 to 40 s (Table 1). The amplitude and cycle or pulse of ultrasound as well as extraction time were evaluated to optimize the extraction of betalains from quinoa hulls as done in similar previous studies for UAE of antioxidants (Pan et al., 2012; Hammi et al., 2015).

One phase RSM using the Box-Behnken design with 3 central points was performed for UAE of betalains from quinoa hulls with the following levels for independent variables: $X_1 = 40$ –100%, $X_2 = 0.2$ –1 and $X_3 = 1$ –5 min. These RSM experiments, determined different levels for independent variables in the M_1 and M_{13} quinoa samples. The extraction time of betalains from the M_1 and M_{13} quinoa samples was drastically reduced in order to find the optimal region (maximum content of betalains). The difference in these levels can be explained by the chemical nature these selected quinoa samples containing betalains chemically different. A previous study demonstrated that betacyanins require less extraction time (90–120 s) than betaxanthin (140–150 s) in an extraction using microwave technology (Cardoso-Ugarte et al., 2014).

A second order polynomial was used for the mathematical modeling of the relationship between the dependent and independent variables

Table 1
Real and coded values of independent variables in response surface model.

Independent variables	Quinoa hulls containing betacyanins (M_1)		Quinoa hulls containing betaxanthins (M_{13})		
	Real values	Coded Values	Real values	Coded Values	
Amplitude (%) ^a	X_1	60	−1	50	−1
		75	0	70	0
		90	+1	90	+1
Cycle	X_2	0.2	−1	0.6	−1
		0.4	0	0.8	0
		0.6	+1	0.1	+1
Extraction time (s)	X_3	2	−1	10	−1
		11	0	25	0
		20	+1	40	+1

^a Real values are percentage of the maximum amplitude. An MS 0.5 standard sonotrode (0.5 mm tip diameter, 140 μm maximum amplitude and 125 W/cm² acoustic power density) was employed to carry out the extraction of betalains.

Table 2

Box-Behnken design to optimize UAE of betalains from colored quinoa hulls containing betacyanins (M_1). The values are mean ± SD (n = 3).

Run	Coded independent variables			Total Betalains ¹ (mg/100 g FW)	Total Saponins ² (mg/g FW)
	X_1	X_2	X_3		
1	0	+1	+1	75.8 ± 1.0	0.94 ± 0.08
2	0	+1	−1	92.3 ± 2.2	0.82 ± 0.06
3	0	−1	+1	67.5 ± 1.5	0.69 ± 0.02
4	−1	+1	0	94.0 ± 2.0	0.89 ± 0.00
5	+1	0	−1	83.3 ± 1.4	0.71 ± 0.00
6	0	0	0	86.2 ± 1.5	1.14 ± 0.06
7	−1	0	−1	64.5 ± 1.0	0.83 ± 0.00
8	+1	0	+1	53.2 ± 0.7	1.11 ± 0.02
9	+1	+1	0	79.7 ± 3.4	0.96 ± 0.05
10	0	0	0	86.2 ± 1.5	0.69 ± 0.02
11	0	0	0	87.4 ± 0.4	0.93 ± 0.07
12	0	−1	−1	79.2 ± 1.4	1.07 ± 0.04
13	+1	−1	0	83.2 ± 3.3	0.90 ± 0.05
14	−1	−1	0	72.6 ± 1.1	1.10 ± 0.03
15	−1	0	+1	72.2 ± 4.5	1.06 ± 0.10

¹ Total content of betalains was assessed as the sum of betacyanins and betaxanthins by a microplate reader spectrophotometric procedure. A residual procedure was used for peak separation and analysis (betacyanins and betaxanthins) using a linear baseline, Savitsky-Golay filter for smoothing and Gauss peak type model.

² Total saponin content was calculated from the following adapted standard curve: mg saponin/g FW = [(0.432 × (foam height) × 0.008)/(g FW)]/10 (Koziol, 1991). The 10 factor was related to the concentration of the prepared solution, in the original method it is 100 mg/mL and in the samples prepared here for ultrasound assisted extraction, it was 10 mg/mL.

(Eq. (1)). The total content of betalains at optimal conditions, estimated using second order polynomials, was validated experimentally. The RSM experiments were designed and analyzed using Minitab 17 software (Minitab Inc., USA).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

where Y was response or dependent variable, X_1 , X_2 and X_3 were independent variables, while β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are the intercept, linear, quadratic and interaction coefficients, respectively. The residual is denoted as ε .

2.4.3. Content of saponins in the ultrasound-optimized extracts

A micro and rapid afrosimetric method adapted from Koziol (1991) was used to measure the content of saponins in the ultrasound-optimized extracts. Briefly, 100 μL of extract was transferred to wells on a 96-well plate and mixed by up-and-down pipette movement for 10 s at room temperature. Immediately afterward, the well was imaged using a smartphone P8 Lite (Huawei Technologies Co. Ltd., Madrid, Spain). Foam height produced by this adapted method was measured on the acquired image using Fiji ImageJ software and the set scale of the known well diameter. In the original method, foam height was calculated using Eq. (2).

$$h_{original\ method} = h_{adapted\ method} \times \left(\frac{D_{well}}{D_{original\ tube}} \right)^2 \quad (2)$$

Where: D and h are respectively diameter and height in mm, respectively. $D_{well} = 8$ mm and $D_{original\ tube} = 16$ mm.

Total content of saponins was calculated from the following adapted standard curve: mg saponin/g FW = [(0.432 × (foam height) × 0.008)/(g FW)]/10 (Koziol, 1991). The 10 factor was related to the concentration of the prepared solution, in the original method it is 100 mg/mL and in the samples prepared here for ultrasound assisted extraction, it was 10 mg/mL.

2.5. Extraction of betalains from quinoa hulls by conventional procedure

Betalains were extracted from colored quinoa hulls using a conventional procedure (Abderrahim et al., 2015). Five milligrams of hull and 500 μ L of water were put into a 1.8 mL round-bottomed cryogenic vial (Nunc[®] CryoTubes[®], Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and mixed under constant shaking at a maximum speed on a “movil rod” shaker (J.P. Selecta S.A., Barcelona, Spain) for 10, 15, 25 and 40 min at room temperature. The supernatants containing betalains were collected from extracts by centrifugation at $2100 \times g$ for 10 min (4 °C). The total content of betalains was assessed as the sum of betacyanins and betaxanthins by the microplate reader spectrophotometric procedure (Abderrahim et al., 2015) (see Section 2.3.1).

2.6. Thermal stability of betalains extracted from quinoa hulls by ultrasound

The thermal stability of betalains extracted from selected quinoa hulls was evaluated under normal cooking conditions using a robot cooker Thermomix TM 31 (Vorwerk, Madrid, Spain). Five milliliters of betalain extracts from both quinoa hull samples were put into transparent plastic bags, sealed and heated at 90 °C for 70 min at the lowest speed agitation and sampled every 10 min for image analysis. Samples were heated in 1.5 L of water, which was previously heated to reach the cooking temperature (90 °C). A beetroot aqueous extract prepared from commercial steam cooked beetroot (El Campo, Madrid, Spain) was used as source of betalains for comparison.

Image analysis was used to measure the content of betalains as thermal color degradation (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016) was measured by image analysis. The images of extracts contained in transparent plastic bags were acquired with an iPad Air 2 (Apple, Madrid, Spain) under natural light. From each image, the region of interest (ROI) was extracted using ImageJ software and exported as TIFF files. TIFF files were analyzed using the free app Android ON color Measure to calculate Red (R), Green (G), Blue (B) and HSV values (Supplementary Fig. 1). From above color values, absolute Euclidean distances (ED) were used as a measurement of the color degradation (Abderrahim et al., 2016; Güneşer, 2016) and calculated from Eq. (3).

$$ED = \sqrt{(R_b - R_s)^2 + (G_b - G_s)^2 + (B_b - B_s)^2 + (H_b - H_s)^2 + (S_b - S_s)^2 + (V_b - V_s)^2} \quad (3)$$

Where R_s , G_s , B_s , H_s , S_s and V_s = Mean of R, G, B, H, S and V, respectively calculated from sample-containing bags and R_b , G_b , B_b , H_b , S_b and V_b = Mean of R, G, B, H, S, and V, respectively calculated from water-containing bags.

ED values were relativized with ED at time = 0 min equal to 100% and the relative Euclidean distance (rED) vs heating time was adjusted to first-order kinetic model (Eq. (4)) to estimate kinetic parameters using a non-linear regression analysis (Fernandez-Lopez et al., 2013; Güneşer, 2016).

$$rED = (rED_0 - Plateau)e^{-kt} + Plateau \quad (4)$$

rED and rED_0 are relative EDs at different heating times and t is heating time (min). Plateau is a minimal rED value in the plateau region and k is the first-order reaction rate constant (min^{-1}).

3. Results and discussion

3.1. Color properties and content of betalain of quinoa hulls

Most of the pigments are located in the quinoa hulls, which are mechanically eliminated by scarification to reduce the bitterness of the seeds. This bitter taste has been associated with the content of tri-terpene saponin that has *in vitro* anti-cancer activity (Kuljanabhagavad et al., 2008). This make, red quinoa hulls a by-product that is a source

of bioactive compounds that should be evaluated.

The color properties of quinoa hulls, ranging in color from red to red-orange (Fig. 1A), were measured by image analysis in order to select the maximal chemical diversity based on their profiles of betalains, which included betacyanins and betaxanthins or a mixture. An earlier study by our research group demonstrated that different tones of red quinoa seeds contain different ratios of betacyanins/betaxanthins (Abderrahim et al., 2015). We studied whether quinoa hulls predominantly containing betacyanins can be extracted by UAE under similar conditions to those of samples with a significant betaxanthin content. The color properties of quinoa hulls for Hue (H°), Saturation (S) and Lightness (L) were calculated from RGB mean values (Fig. 1B). The following HSL color values were found in the samples: -5 (M_1), 1 (M_2), -5 (M_5), 4 (M_7) and 5 (M_{13}) for H° ; 50.2 (M_1), 46.6 (M_2), 44.1 (M_5), 43.4 (M_7) and 53.7 (M_{13}) for S%; and 53.5 (M_1), 56.7 (M_2), 48.1 (M_5), 52.2 (M_7) and 51.8 (M_{13}) for L%. Like those previously found in red quinoa seeds (Abderrahim et al., 2015), the quinoa hulls showed H values ranging from $+5^\circ$ to -5° and L values between 48.1 and 56.7%. The Saturation degree ($43.4\% < S < 53.7\%$) reflected that the principal color in the hull samples was not as pure as had been found previously in red quinoa seeds (Abderrahim et al., 2015). In a recently study with six red quinoa seeds, CIELab color was measured by spectrophotometry (Escribano et al., 2017). L values varied from 45.30 to 48.28, a^* from 17.20 to 23.99 and b^* from 5.11 to 11.24 (Escribano et al., 2017). When the CIELab values for red quinoa seeds were converted to the HSL color space, the following values were found $H = -4.4$ – 1.9° , $S = 17.6$ – 24.4% and $L = 45.7$ – 49.8% . The H and L values were similar to those found in red quinoa hulls but the S values were lower, which could be explained by partial loss of hull from the quinoa seed samples. The presence of quinoa seed without hull would increase the color heterogeneity measured by spectrophotometry with a coupled integrated sphere accessory.

Two color spaces, a classical RGB and less common KLT/PCA, were evaluated as simple procedures to group red quinoa hulls based on their profiles of betalains. As a reference procedure, absorption spectrum of aqueous extract of betalains from 400 to 700 nm was performed using a microplate reader, which is a costly analytical high-throughput technology. The absorption spectrum for the aqueous M_{13} hull quinoa extract showed a $\lambda_{\text{max}1}$ at 475 nm and another $\lambda_{\text{max}2}$ at 540 nm (Fig. 1D), respectively related to the presence of betaxanthin or betacyanins. There is more betaxanthin in this quinoa sample than betacyanins. The M_5 sample showed approximately equal peak intensities at $\lambda_{\text{max}} = 475$ nm and 540 nm, but the peak at $\lambda_{\text{max}} = 535$ nm was the predominant peak in the M_1 , M_2 and M_7 samples. Therefore, M_1 and M_{13} quinoa hull were identified as samples containing predominantly betacyanins and betaxanthins.

The RGB histogram of the samples showed the blue channel could distinguish between the different M_1 and M_{13} quinoa hull samples (Fig. 1B). The relevance of the blue histogram as a discriminant variable for red to reddish-orange quinoa seeds is related to the response by this channel to changes in the red tones (Sorouraddin et al., 2015). The reflectance spectrum for whole seeds acquired with an integrated sphere-accessory on a Lambda 950 UV/Vis/NIR spectrophotometer confirmed that the blue histogram can be used to classify red quinoa seed samples (data not shown). The KLT/PCA color space improved the discrimination between M_1 and M_{13} samples and even allowed us to establish three quinoa groups: M_{13} ; M_5 an intermediate sample, and a unique cluster M_1 , M_2 and M_7 (Fig. 1C). Consequently, the KTL/PCA color space can be used to classify red quinoa seed samples using image analysis and it could be a low-cost and non-invasive alternative to the high-throughput microplate reader technology to classify red quinoa samples based on their profiles of betalains (content of betacyanins and betaxanthins).

Regarding the total content of betalains of colored quinoa hulls, the pigment content ranged from 36.6 ± 2.6 to 218.2 ± 12.3 mg/100 g, significantly higher than what was found in whole colored quinoa seeds

Table 4

Total content of betacyanins, betaxanthins and betalains of colored quinoa hulls from the Peruvian Altiplano. The values are mean \pm SD (n = 3).

Samples	Total betacyanins ^a (mg/100 g FW)	Total betaxanthins ^b (mg/100 g FW)	Total betalains ^c (mg/100 g FW)	Betaxanthin/ Betacyanin
M ₁	82.5 \pm 2.7	17.8 \pm 5.1	100.3 \pm 7.8	0.215 \pm 0.054
M ₂	34.5 \pm 2.5	2.1 \pm 5=0.2	36.6 \pm 2.6	0.062 \pm 0.050
M ₅	89.6 \pm 3.3	23.9 \pm 2.1	113.5 \pm 5.1	0.266 \pm 0.017
M ₇	83.5 \pm 5.0	0.0 \pm 0.0	83.5 \pm 5.0	0.000 \pm 0.000
M ₁₃	70.7 \pm 5.4	147.4 \pm 7.5	218.2 \pm 12.3	2.089 \pm 0.089

A residual procedure was used for peak separation and analysis (betacyanins and betaxanthins) using a linear baseline, a Savitsky-Golay filter for smoothing and Gauss peak type model.

^a Total betacyanins (MW = 550.46 g/mol).

^b betaxanthins (MW = 538.35 g/mol) were quantified from estimated absorbance using molar extinction coefficients of 60,000 and 48,000 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectively.

^c Total content of betalains was assessed as the sum of betacyanins and betaxanthins by a microplate reader spectrophotometric procedure. M₁ = Red Pasankalla, M₂ = Pink Pasankalla, M₅ = Red Chullpi, M₇ = Pink Capachica and M₁₃ = Bright Red Pasankalla.

(Abderrahim et al., 2015; Escribano et al., 2017) (Table 4). The quinoa seed hulls represent about 3–4% of the total weight and could therefore explain the higher content of betalains in hulls than in the whole quinoa seed. In agreement with the KTL/PCA color space finding, the quinoa sample group that includes M₁, M₂, M₅ and M₇ were very rich in betacyanins while M₁₃ sample has the highest betaxanthin content. The ratio of betaxanthins/betacyanins (BXBC-R) of the samples in the first group varied between 0.000–0.266 \pm 0.017 and was 2.089 \pm 0.089 in the M₁₃ sample (Table 4). In agreement with our results, a previous study by our research group demonstrated that the BXBC-R ranged between 0.0 and 0.55 in red quinoa samples collected from Peruvian Altiplano region (Abderrahim et al., 2015). In the same way, a study recently carried out with colored quinoa samples from the germplasm Bank at the National Agricultural University La Molina (Lima, Peru), showed high content of betacyanins in red samples measured by HPLC with BXBC-R from 0.07 to 0.34 (Escribano et al., 2017). In agreement with color properties analyzed by image analysis, the M₁ (BXBC-R = 0.215 \pm 0.054) and M₁₃ (BXBC-R = 2.089 \pm 0.089) ratios are representative and indicate different red quinoa samples, and thus, they were chosen to optimize betalains UAE. The M₁₃ sample had not been studied previously and is unique, since it contains higher amount of betaxanthins than betacyanins.

3.2. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of betalains from quinoa hulls using response surface methodology

3.2.1. Analysis of the models

A Box-Behnken design was employed to optimize the extraction of betalains from quinoa hulls (sample M₁ and M₁₃) by ultrasound (Table 1-3). For quinoa sample M₁, which had a higher content of betacyanins than betaxanthins, the ANOVA regression model ($p < 0.001$) and R² adjusted (0.99) confirmed that the quadratic model produced good estimation of total betalains. The lack-of-fit was non-significant ($p = 0.173$), meaning that the total content of betalains can be accurately predicted using the obtained quadratic model. The optimal condition for the betalains UAE from the M₁ quinoa sample were: amplitude = 70%; cycle = 0.6 and a very short extraction time = 9.2 s; these optimal ultrasound treatments could extract 96.477 mg of betalains per 100 g FW (Fig. 2). Similarly, another quadratic model gave a good prediction of the amount of betalains extracted from M₁₃ quinoa hulls by ultrasound ANOVA regression model ($p < 0.001$); R² = 0.94; lack-of-fit ($p = 0.695$). In this latter case, the optimum conditions for UEA of betalains from quinoa hull samples were: amplitude = 90%; cycle = 0.7 and short extraction

time = 40 s; these conditions yielded 201.01 mg of betalains per 100 g FW (Fig. 3). Interestingly, for both quinoa hull samples the operation of ultrasound equipment in pulse mode (cycles) was required for optimal extraction of betacyanins and betaxanthins.

In order to compare UAE conditions for betalains extraction from different plant sources, specific energy consumption E_{US} (J/g) was calculated from the equation (E_{US} = Output power x extraction time or ultrasound treatment (s)/sample weight) reported by Koubaa et al. (2016). Since ultrasound is a mechanical wave, its characteristics, like frequency and amplitude – which are dependent on the ultrasound apparatus – can regulate ultrasonic intensity (Chemat et al., 2017). When using UAE to extract betalains from quinoa hulls, the sonotrode diameter (0.5 mm), acoustic power density (125 W/cm²) as well as amplitude, cycles or pulse and sample weight were used to calculate E_{US}. Values of E_{US} = 3.1 J/g and 13.6 J/g were found for the M₁ and M₁₃ quinoa hull, respectively. The different ultrasound extraction times required for M₁ and M₁₃ quinoa hulls could be related to their content of betacyanins and betaxanthins (Fig. 1D). Previous study has demonstrated that betacyanins require less extraction time (90–120 s) than betaxanthin (140–150 s) in an extraction using microwave technology (Cardoso-Ugarte et al., 2014). In addition, the E_{US} for quinoa hulls were markedly lower than those used to extract betalains by UAE from malabar spinach – E_{US} = 981.3 J/g- (Maran and Priya, 2015), red beet stalks – E_{US} = 934.5 J/g- (Maran and Priya, 2016) and red prickly pear peels and pulps – 364 to 1090 J/g- (Koubaa et al., 2016). The extraction yields with ultrasound treatment may vary due to plant matrix structure, plasticity or compositional differences which will result in different degrees of impact from cavitation effects (Chemat et al., 2017). Thus, different yield of betalains from red dragon fruit were obtained using UAE for the peel (47.07%) and flesh (90.08%) (Ramli et al., 2014). The E_{US} values found with UAE for quinoa hull betalains suggest that this plant is a good source for these pigments, which are easily and quickly extracted. A short ultrasound process made it possible to extract amounts of betalains similar to those obtained by conventional “movil rod” shaking, which requires 30 min extraction time instead 10–40 s (Fig. 4).

3.2.2. Effect of amplitude, cycle and extraction time on total content of betalains

For quinoa sample M₁, the model showed that the most significant linear variable that influences on the total content of betalains was extraction time (F-value = 192.72, $p < 0.001$), followed by cycle (F-value = 117.39, $p < 0.001$). However, amplitude had no significant effect on total content of betalains (F-value = 1.15, $p > 0.05$). Meanwhile all quadratic term and two-way interaction ($p < 0.01$), except the interaction between cycle and extraction time (F-value = 3.51, $p > 0.05$) had significant effect on the total content of betalains. For M₁₃ quinoa hull, the total content of betalains was significantly influenced for the amplitude (F-value = 15.99, $p < 0.05$) and extraction time (F-value = 11.86, $p < 0.05$) and had no significant effect was found for cycle (F-value = 3.98, $p > 0.05$). Quadratic term for cycle (F-value = 12.27, $p < 0.05$) and interaction between amplitude and cycle (F-value = 27.16, $p < 0.001$) had significant effect on total content of betalains.

The response surface plots demonstrate the relationship between UAE parameters (amplitude, cycle and extraction time) and the total content of betalains (Figs. 2 and 3). For the quinoa sample M₁, total content of betalains was increased with the cycle and extraction time (Fig. 2A–C). A previous study has demonstrated that cycle (pulse mode operation) increases the UAE efficiency due it promotes a non-steady state mass transfer (Sivakumar et al., 2009). However, lower cycle could not be sufficient to complete extraction of betalains because it reduces the ultrasound treatment. On the other hand, total content of betalains increased with the increase of the extraction time and reached its peak at about 10 s (Fig. 2C). After that value, extraction time had a negative effect on the total content of betalains (Fig. 2C), which could

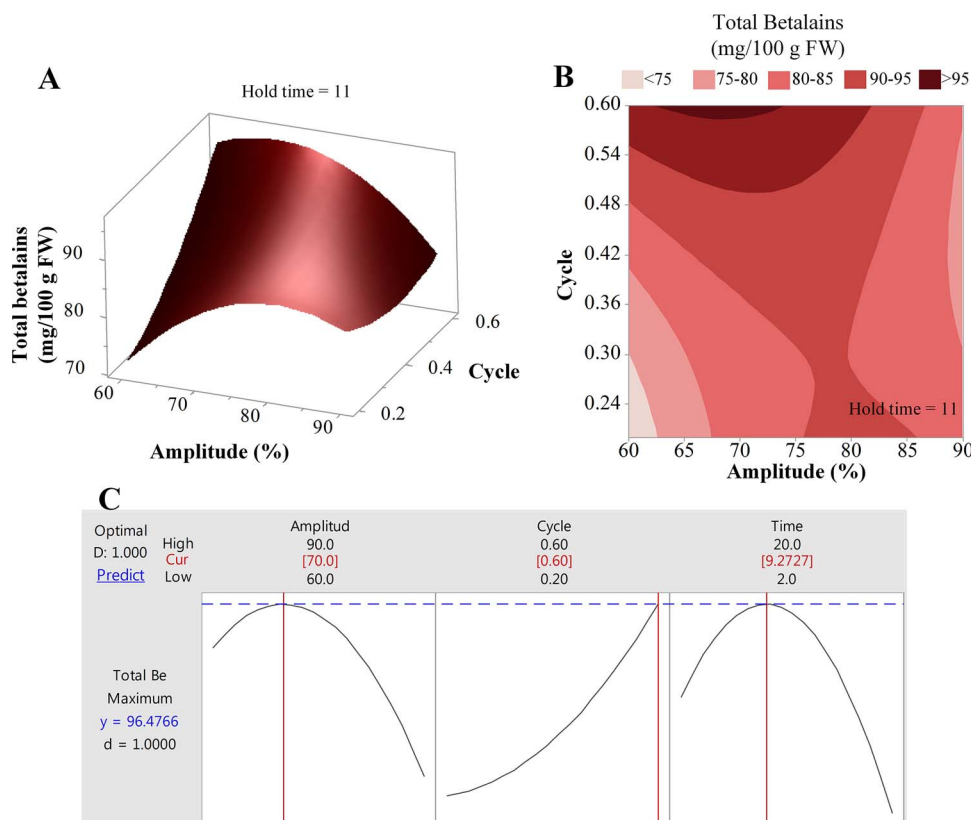


Fig. 2. Response surface (A) and contour (B) plot for UAE of betalains from betacyanins-containing colored quinoa hulls (M_1). The optimum conditions for betalain extraction are shown in (C). The maximum total betalain extraction was 96.47 mg/100 g FW. Values are mean \pm SD of triplicate measurements.

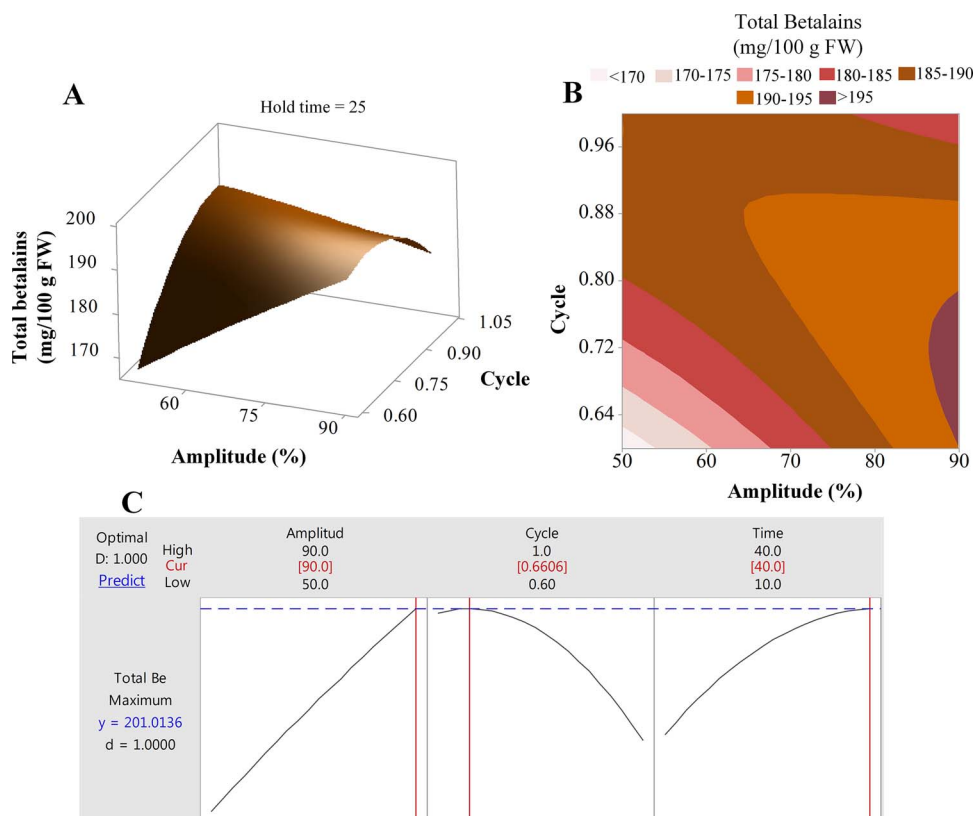


Fig. 3. Response surface (A) and contour (B) plot for UAE of betalains from betaxanthins-containing quinoa hulls (M_{13}). Optimal conditions for betalain extraction are shown in (C). The maximum total betalain extraction was 201.01 mg/100 g FW. Values are mean \pm SD of triplicate measurements.

be related with a degradation of betalains by reactive oxygen species generated for longer time of acoustic cavitation (Kentish and Ashokkum, 2011; Roriz et al., 2017). Similarly, amplitude trend to increases the total content of betalains an intermediate value (Fig. 2C). In

the case of M_{13} quinoa hull, total content of betalains was increased with the amplitude and extraction time (Fig. 3A–C). It is known-well that ultrasonic intensity is directly correlated to the amplitude of the transducer and consequently to the pressure amplitude of sound wave.

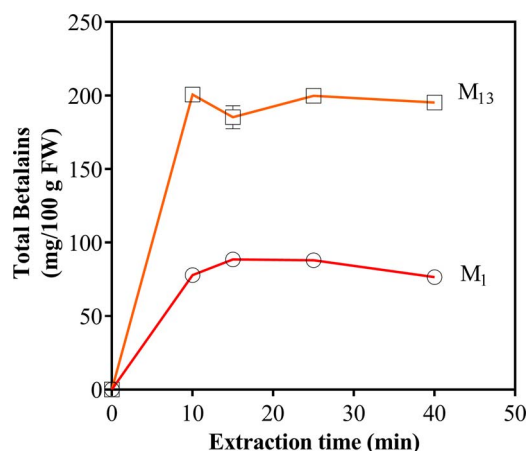


Fig. 4. Conventional betalain extraction from quinoa hulls. A “movil rod” shaker was used to extract betalains at room temperature. M₁ and M₁₃ are quinoa samples that respectively contain mostly betacyanins or betaxanthins. Values are mean \pm SD of triplicate measurements.

Thus, an increase in amplitude generally results in an increase of sonochemical effects and extraction yield (Chemat et al., 2017; Maran and Priya, 2015). Similarly, an increasing in the extraction time is associated with the power input and improves the extraction by ultrasound (Chemat et al., 2017). Moreover, cycle trend to increases the UAE yield of betaxanthins for M₁₃ sample reached the maximum value for a cycle value about 0.6 (Fig. 3C).

On the other hand, the UAE of betalains from quinoa hulls was not completely selective since saponins were also extracted along with betalains for all the runs using the Box-Behnken design. Total content of saponins between 0.69 and 1.14 mg/g FW, and 0.51 and 0.62 mg/g FW were found in the M₁ and M₁₃ quinoa hulls, respectively (Table 2 and 3 and Supplementary Fig. 2). The advantage of totally eliminating saponins from extract of betalains should be evaluated because saponins have several beneficial biological properties (Vilcacundo and

Table 3

Box-Behnken design to optimize UAE of betalains from colored quinoa hulls containing betaxanthins (M₁₃). The values are mean \pm SD (n = 3).

Run	Coded independent variables			Total Betalains ¹ (mg/100 g FW)	Total saponins ² (mg/g FW)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	0	0	0	194.9 \pm 3.4	0.61 \pm 0.03
2	0	+1	-1	180.7 \pm 2.1	0.53 \pm 0.01
3	+1	-1	+1	193.9 \pm 8.7	0.49 \pm 0.02
4	0	-1	+1	184.3 \pm 0.6	0.57 \pm 0.02
5	0	-1	-1	173.8 \pm 4.5	0.56 \pm 0.01
6	+1	0	+1	198.8 \pm 5.9	0.51 \pm 0.01
7	0	0	0	186.8 \pm 6.3	0.62 \pm 0.02
8	-1	0	-1	178.6 \pm 1.6	0.57 \pm 0.03
9	0	+1	+1	182.0 \pm 8.9	0.57 \pm 0.03
10	-1	0	+1	183.8 \pm 4.6	0.51 \pm 0.02
11	-1	-1	0	165.3 \pm 6.4	0.52 \pm 0.02
12	0	0	0	189.7 \pm 2.7	0.60 \pm 0.02
13	+1	0	-1	181.9 \pm 2.5	0.51 \pm 0.02
14	-1	+1	0	190.9 \pm 2.7	0.55 \pm 0.06
15	+1	+1	0	183.3 \pm 6.0	0.55 \pm 0.01

¹ Total content of betalains was assessed as the sum of betacyanins and betaxanthins by a microplate reader spectrophotometric procedure. A residual procedure was used for peak separation and analysis (betacyanins and betaxanthins) using a linear baseline, Savitsky-Golay filter for smoothing and Gauss peak type model.

² Total content of saponins was calculated from the following adapted standard curve: mg saponin/g FW = [(0.432 \times (foam height) \times 0.008)/(g FW)]/10 (Koziol, 1991). The 10 factor was related to the concentration of the prepared solution, in the original method it is 100 mg/mL and in the samples prepared here for ultrasound assisted extraction, it was 10 mg/mL.

Hernández-Ledesma, 2017). Saponins could confer a unique and bi-functional pharmacological properties on M₁ and M₁₃ extracts. From a technological viewpoint, extract microencapsulation could reduce the bitter taste and would also improve the stability of betalains (Otálora et al., 2015).

3.3. Thermal stability of betalains extracted from quinoa hulls by ultrasound

Approved as a natural colorant, betalains have been used in different food products like candy, yogurt, ice cream, salad dressing, powdered drink mix, soft drink and dessert gelatin. However, compared to synthetic dyes, their wider use is greatly limited by their poor stability during processing and storage (Celli and Brooks, 2017; Delgado-Vargas et al., 2000). Different factors like high temperature, light and oxygen pressure have been reported to reduce the stability of betalains, thus affecting the shelf-life of betalain-containing foods (Khan, 2016). The chemical nature of betalains, including their degree of glycosylation and acylation, also affects their stability and varies with the source from which the pigment was extracted (Khan, 2016). Differently from other sources of betalains, a recent publication has shown that colored quinoa samples from the Peruvian Altiplano contain significant amounts of amaranthin (121.9–148.6 mg/kg FW), isoamaranthin (108.3–145.5 mg/kg FW), and dopaxanthin (35.9–85.3 mg/kg FW) (Escribano et al., 2017). This finding suggests that the thermal stability of betalains extracted from colored quinoa hulls may be different from betalains from other sources and this should be evaluated.

Like beetroot betalains (BR), M₁ and M₁₃ quinoa sample betalains showed a first-order degradation reaction kinetics at 90 °C (Fig. 5C). A

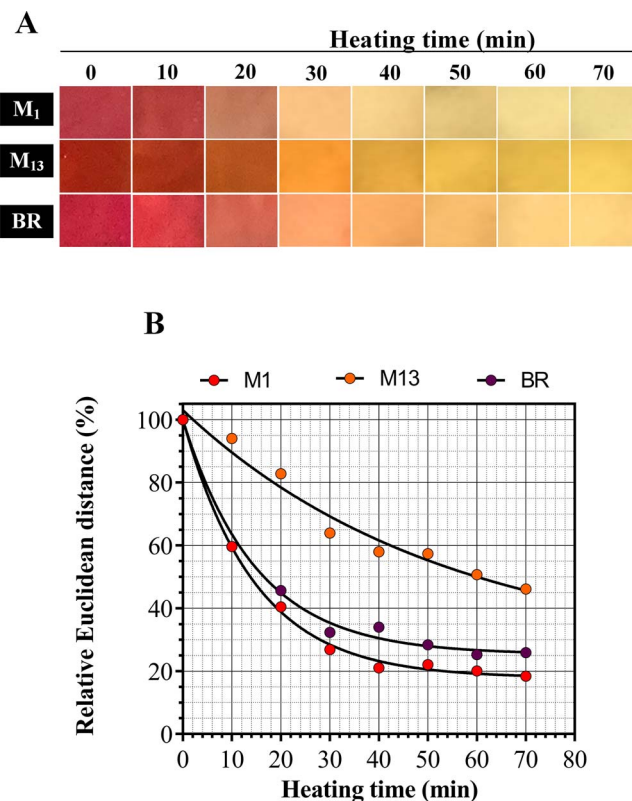


Fig. 5. Thermal stability of betalain from colored quinoa hulls extracted in water by ultrasound. The robot cooker was used to heat extracts at 90 °C for different times at lowest speed agitation and sampled every 10 min for image analysis. An iPad Air was used to acquire an extract image (B). Relative Euclidean distance (mean \pm SD of triplicate measurements), based on RGB and HSV values measured with free Android app ON color Measure, was used to monitor betalain stability. BR is a betalain extracted from commercial steam cooked beetroots.

Table 5

The kinetic parameters for degradation of ultrasound-extracted betalains based on changes in color values. The values are mean \pm SD (n = 3).

Samples	RED ₀	First-order reaction kinetic parameters ¹			
		Plateau	Half-life (t _{1/2}) (min)	k (min ⁻¹)	R ²
M ₁	100.2 \pm 1.6 ^a	17.8 \pm 1.1 ^a	10.2	0.068 \pm 0.003 ^a	0.99
M ₁₃	103.0 \pm 3.9 ^a	ND	37.0	0.019 \pm 0.008 ^b	0.97
BR	99.9 \pm 2.5 ^a	25.3 \pm 1.8 ^b	10.4	0.067 \pm 0.007 ^a	0.99

¹ An exponential model following the $rED = (rED_0 - \text{Plateau}) e^{(-k \cdot t)} + \text{Plateau}$ was used to fit experimental data. rED and rED_0 are relative ED at different heating times (t, min). Plateau is a minimal rED value in the plateau region, k is the first-order reaction rate constant, and Half-life is the heating time needed to reduce the rED value by 50% (calculated from k). Letters indicate differences in statistical significance. ND means a very high standard error was found for parameter.

recent report has demonstrated that thermal degradation of beetroot betalains in the presence of milk also followed first-order reaction kinetics at 70–90 °C, i.e. increased temperature and heating is associated with greater degradation (Fernandez-Lopez et al., 2013; Güneşer, 2016). Moreover, our data showed that the degradation of betalains can be monitored by a simple smartphone-based image analysis using the Euclidean distance from RGB and HSV space color values (Fig. 5B–C). Previous study has established that the content of betalains can be predicted from a colorimeter-based multiple regression model during thermal treatment (Chandran et al., 2014; Güneşer, 2016). The thermal stability of betalains extracted from the M₁ quinoa sample was similar to that of betalains from beetroot (BR) at 90 °C (Fig. 5C) with first-order rate constants (k) of 0.068 \pm 0.003 and 0.067 \pm 0.007 min⁻¹ and half-life (t_{1/2}) of 10.2 and 10.4 min, respectively (Table 5). The thermal stability at 90 °C was higher for the betalains from the M₁₃ quinoa sample than for those extracted from the M₁ and BR samples, $k = 0.019 \pm 0.008$ min⁻¹ and t_{1/2} = 37 min. Previous studies on thermal stability in beetroot betalains have found a $k = 0.91$ h⁻¹ (0.015 min⁻¹) and t_{1/2} = 0.79 h (47.4 min) (Fernandez-Lopez et al., 2013) or $k = 0.0109$ min⁻¹ and t_{1/2} = 64 min at 90 °C (Chandran et al., 2014). In a recent study, the kinetics of degradation of betalains in beetroot at 90 °C in milk occurred quickly with $k = 0.031 \pm 0.003$ min⁻¹ and t_{1/2} = 22.5 min (Güneşer, 2016). The divergence in the kinetic parameters for degradation of betalains in beetroots could be related to the presence of antioxidant compounds like ascorbic acid or phenolics, which depend on matrix composition and extraction procedures. Ascorbic acid is known to increase the stability of betalains but the co-pigmentation effect from a phenolic compound depends on the phenolic chemical and requires further study (Khan, 2016). In betalains, thermal degradation occurs through complex reactions such as isomerization, dehydrogenation, decarboxylation and hydrolysis that produce several chromatic and structural changes (Azeredo, 2009; Khan, 2016). The t_{1/2} value for betalains from the M₁₃ quinoa sample was in the same range as betalains extracted from a native Taiwanese cereal, Djulis (*Chenopodium formosanum*) (18.33–63.76 min at pH 3–7 at 90 °C) (Tsai et al., 2010). Djulis cereal extract mostly contained betanin and isobetanin (77.3%) and lower fractions of amaranthin (13.6%) and isoamaranthine (8.6%) (Tsai et al., 2010). Based on color properties and absorption spectrum, M₁₃ quinoa samples could contain significant amounts of betaxanthins (Escribano et al.). Finally, the presence of saponins in the extract of betalains did not affect pigment stability since the k and t_{1/2} values at 90 °C were equal for the extract containing saponins and for that in which saponins had been partially eliminated by shaking as afrosimetric procedure (data not shown). However, the effects of different concentration of saponins on the thermal stability of quinoa hull betalains remain to be studied.

4. Conclusion

Optimal ultrasound-assisted extraction of betalains from colored quinoa hulls can be carried out in water at very short processing times of 9.2 or 40 s for samples containing betacyanins and betaxanthins, respectively. Extracts prepared by ultrasound are as or even more stable than those extracted from beetroots and contain low concentration of saponins. Quinoa hulls are a by-product that is a good source of betalains and saponins and could be a unique bifunctional ingredient for the food and/or pharmaceutical industries.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are indebted to Universidad Nacional de Juliaca (UNAJ) for the funding received from the Project Canon Minero 2013, Resolution No. 102-2013-CO-UNAJ Puno, Peru.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.034>.

References

- Abderrahim, F., Huanatico, E., Segura, R., Arribas, S., Gonzalez, M.C., Condezo-Hoyos, L., 2015. Physical features phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa Willd.*) from Peruvian Altiplano. *Food Chem.* 183, 83–90.
- Abderrahim, M.M., Arribas, S., Condezo-Hoyos, L., 2016. A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods. *Talanta* 152, 82–89.
- Azeredo, H.M.C., 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2365–2376.
- Cardoso-Ugarte, G.A., Sosa-Morales, M.E., Ballard, T., Liceaga, A., San Martín-González, M.F., 2014. Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT – Food Sci. Technol.* 59, 276–282.
- Celli, G.B., Brooks, M.S.-L., 2017. Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins – a current review. *Food Res. Int.* 100, 501–509.
- Chandran, J., Nisha, P., Singhal, R.S., Pandit, A.B., 2014. Degradation of colour in beetroot (*Beta vulgaris* L.): a kinetics study. *J. Food Sci. Technol.* 51, 2678–2684.
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Allaf, T., Vorobiev, E., 2015. Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends Anal. Chem.* 71, 157–168.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34, 540–560.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez, O., 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 173–289.
- Escribano, J., Cabanes, J., Jiménez-Atiénzar, M., Ibañez-Tremolada, M., Gómez-Pando, L.R., García-Carmona, F., Gandía-Herrero, F., 2017. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. *Food Chem.* 234, 285–294.
- Fernandez-Lopez, J.A., Angosto, J.M., Gimenez, P.J., Leon, G., 2013. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum.* 68, 11–17.
- Güneşer, O., 2016. Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment. *Food Chem.* 196, 220–227.
- Gengatharan, A., Dykes, G.A., Choo, W.S., 2015. Betalains: natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT – Food Sci. Technol.* 64, 645–649.
- Hammi, K.M., Jdey, A., Abdely, C., Majdoub, H., Ksouri, R., 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chem.* 184, 80–89.
- Kentish, S., Ashokkum, M., 2011. The physical and chemical effects of ultrasound. In: Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, New York, pp. 1–12.
- Khan, M.I., 2016. Stabilization of betalains: a review. *Food Chem.* 197 (Part B), 1280–1285.
- Koubaa, M., Francisco, J., Barba, F.J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Nadia Boussetta, N., Vorobiev, E., 2016. Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 37, 336–344.
- Koziol, M.J., 1991. Afrosimetric estimation of threshold saponins concentration for

- bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). J. Sci. Food Agric. 54, 211–219.
- Kuljanabagavad, T., Thongphasuk, P., Chamulitrat, W., Wink, M., 2008. Triterpene saponins from chenopodium quinoa willd. Phytochemistry 69, 1919–1926.
- Loginova, K.V., Lebovka, N.I., Vorobiev, E., 2011. Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. J. Food Eng. 106, 127–133.
- Maran, J.P., Priya, B., 2015. Natural pigments extraction from Basella rubra L: fruits by ultrasound-assisted extraction combined with box-Behnken response surface design. Sep. Sci. Technol. 50, 1532–1540.
- Maran, J.P., Priya, B., 2016. Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. J. Food Sci. Technol. 53, 792–799.
- Maran, J.P., Manikandan, S., Mekala, V., 2013. Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box-Behnken design with desirability function. Ind Crops Prod. 49, 304–311.
- Otálora, M.C., Carriazo, J.G., Iturriaga, L., Nazareno, M.A., Osorio, C., 2015. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. Food Chem. 187, 174–181.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G.G., McHugh, T.H., 2012. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. Ultrason. Sonochem. 19, 365–372.
- Ramli, N.S., Ismail, P., Rahmat, A., 2014. Influence of conventional and ultrasonic-assisted extraction on phenolic contents, betacyanin contents, and antioxidant capacity of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). Sci. World J. 2014, 964731.
- Roriz, C.L., Barros, L., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. Ind. Crops Prod. 105, 29–40.
- Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M.R., San Martin-Martinez, E., Zepeda, L.G., 2013. Extraction stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. J. Agric. Food Chem. 61, 11995–12004.
- Sivakumar, V., Anna, J.L., Vijayeeswarri, J., Swaminathan, G., 2009. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. Ultrason. Sonochem. 16, 782–789.
- Sorouraddin, M.-H., Saadati, M., Mirabi, F., 2015. Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. J. Food Drug Anal. 23, 447–452.
- Tang, Y., Li, X., Zhang, B., Chen, P.X., Liu, R., Tsao, R., 2015. Characterisation of phenolics: betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa Willd.* genotypes. Food Chem. 166, 380–388.
- Tsai, P.J., Sheu, C.H., Wu, P.H., Sun, Y.F., 2010. Thermal and pH stability of betacyanin pigment of *Djulius (Chenopodium formosanum)* in Taiwan and their relation to antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 58, 1020–1025.
- Vega-Galvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., Martinez, E.A., 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*): an ancient Andean grain: a review. J. Sci. Food Agric. 90, 2541–2547.
- Vilcacundo, R., Hernández-Ledesma, B., 2017. Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). Curr. Opin. Food Sci. 14, 1–6.

Manuscript Number:

Title: Microencapsulation of betacyanin from organic quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and accelerated storage stability using a Oxitest system

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: Quinoa, Betacyanin, Spray-drying, Microencapsulation, Betacyanin stability, Oxitest

Corresponding Author: Dr. Luis Condezo, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidad Autonoma de Madrid

First Author: Silvana Aguilar-Tuesta

Order of Authors: Silvana Aguilar-Tuesta; Wile Mamani-Navarro; Clara Espinoza-Silva; Jaime Basilio-Atencio; Luis Condezo, PhD

Abstract: A face centered central composite design was used to evaluate the effect of inlet air temperature, air flow rate and maltodextrin concentration on encapsulated betacyanin extracted in water from organic black quinoa. Optimal microencapsulation was obtained at a drying temperature of 165 °C, air flow rate of 47 mm and 10 % w/v maltodextrin, which produced good encapsulation yield (58.1%) and efficiency (100%). Optimized maltodextrin-betacyanin microcapsules (diameter = 4.4 µm) have low moisture ($1.64 \pm 0.08\%$) and water activity (0.127 ± 0.006), betacyanin 19.95 ± 0.07 mg/100 g and saponin <8 mg/100 g. The stability of the optimized maltodextrin-betacyanin microencapsulates under accelerated conditions was measured as oxygen consumption using an Oxitest system. The oxygen consumption rate by betacyanins was $-4.37310 \cdot 10^{-5}$ bar.min⁻¹ at 80 °C and $-6.67 \cdot 10^{-5}$ bar.min⁻¹ at 90°C and betacyanin degradation caused color fading. Quinoa maltodextrin- betacyanin microcapsules that also contain saponin could have unique healthy properties.

Dear Prof. PhD. P. Finglas

Editor-in-Chief

Food Chemistry

Please find the manuscript entitled “**Microencapsulation of betacyanin from organic quinoa (Chenopodium quinoa Willd) and accelerated storage stability using a Oxitest system**” to be consideration for publication in Food Chemistry.

All the co-authors have read and approved the revised manuscript and it has neither been published nor is currently under consideration for publication by any other journal.

Sincerely yours,



Dr. Luis Condezo-Hoyos

Universidad Autonoma de Madrid, Spain

Scientific Analyst & Consultant, Lima, Peru

Highlights:

- ❖ Optimized betacyanin microcapsules was obtained from organic quinoa aqueous extract.
- ❖ Microencapsulates contains betacyanin and low saponin concentration.
- ❖ Microencapsulates stability was measured as oxygen consumption using an Oxitest system.
- ❖ Microencapsulates could have unique healthy properties.

1 **Microencapsulation of betacyanin from organic quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*)**
2 **and accelerated storage stability using a Oxitest system**

3
4 Silvana Aguilar-Tuesta¹, Wile Mamani-Navarro¹, Clara Espinoza-Silva², Jaime Basilio-
5 Atencio³, Luis Condezo-Hoyos^{4*}

6
7
8 ¹Universidad Nacional de Juliaca, Escuela Profesional de Industrias Alimentarias, Juliaca,
9 Peru

10 ²Universidad Nacional del Centro del Peru, Facultad de Industrias Alimentarias, Huancayo,
11 Peru

12 ³Universidad Nacional de la Selva, Facultad de Industrias Alimentarias, Tingo María, Peru

13 ⁴Scientific Analyst & Consultant, Lima, Peru

14
15 *Corresponding Author:

16 Dr. Luis Condezo-Hoyos

17 Research Manager - Scientific Analyst & Consultant, Lima, Peru

18 E-mail address: lcondezo@s-analyst.com; lcondezotm@hotmail.com (L. Condezo-Hoyos).

19 Tel: +51 940868287 - +34 666778707

20

21 **ABSTRACT**

22 A face centered central composite design was used to evaluate the effect of inlet air
23 temperature, air flow rate and maltodextrin concentration on encapsulated betacyanin
24 extracted in water from organic black quinoa. Optimal microencapsulation was obtained at a
25 drying temperature of 165 °C, air flow rate of 47 mm and 10 % w/v maltodextrin, which
26 produced good encapsulation yield (58.1%) and efficiency (100%). Optimized maltodextrin-
27 betacyanin microcapsules (diameter = 4.4 μm) have low moisture (1.64 ± 0.08%) and water
28 activity (0.127 ± 0.006), betacyanin 19.95 ± 0.07 mg/100 g and saponin <8 mg/100 g. The
29 stability of the optimized maltodextrin-betacyanin microencapsulates under accelerated
30 conditions was measured as oxygen consumption using an Oxitest system. The oxygen
31 consumption rate by betacyanins was -4.37310^{-5} bar.min⁻¹ at 80 °C and -6.67×10^{-5} bar.min⁻¹
32 at 90°C and betacyanin degradation caused color fading. Quinoa maltodextrin- betacyanin
33 microcapsules that also contain saponin could have unique healthy properties.

34

35

36

37

38

39

40

41 **Keywords:** Quinoa, Betacyanin, Spray-drying, Microencapsulation, Betacyanin stability,

42 Oxitest

43 **1. Introduction**

44 Betalains are presently gaining popularity as pigments for use as natural colorants and/or
45 bioactive compounds in the functional food and pharmaceutical industries due to their anti-
46 oxidant, anti-cancer, anti-lipidemic and anti-microbial activities (Gengatharan, Dykes, &
47 Choo, 2015). A pseudo-cereal, quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) has been recognized as
48 an extremely nutritious grain all over the world (Vega-Galvez, Miranda, Vergara, Uribe,
49 Puente, & Martinez, 2010; Vilcacundo & Hernández-Ledesma, 2017) and has recently been
50 found to be a novel and good betalain source (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas,
51 Gonzalez, & Condezo-Hoyos, 2015; Escribano, Cabanes, Jiménez-Atiénzar, Ibañez-
52 Tremolada, Gómez-Pando, García-Carmona, et al., 2017). Betalains are not widely used in
53 the food industry due to their poor stability during processing and storage (Kavitha
54 Ravichandran, Saw, Mohdaly, Gabr, Kastell, Riedel, et al., 2013). Several factors including
55 chemical structure, temperature, water activity, light, oxygen, ion metal content and some
56 enzymes like peroxidase and glucosidases have been demonstrated to influence betalain
57 stability (Azeredo, 2009; Khan, 2016).

58 Microencapsulation has been studied as a protected-delivery procedure to stabilize and
59 improve availability and accessibility of bioactive compounds (Vieira da Silva, Barreira, &
60 Oliveira, 2016). Microencapsulation has been typically used to produce stable dry
61 encapsulated phytochemicals that are used as food colorants, additives, and flavoring (Vila,
62 Chaud, & Balcão, 2015). In the food industry, microencapsulation is commonly carried out
63 using spray- drying technology, which is economical, flexible, continuous, and can attain
64 high yields of good quality capsules (Anandharamkrishnan & Padma Ishwarya, 2015).
65 Optimal spray-drying conditions using several encapsulating agents (maltodextrin with
66 different dextrose equivalent degrees, pectin, gum xanthan, or mixtures of protein and
67 polysaccharides) have been applied to microencapsulate betalain extracted from conventional

68 sources such as cactus (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, & Yáñez-Fernández, 2015; Saénz,
69 Tapia, Chávez, & Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014),
70 amaranthus (Cai & Corke, 2000) and beetroot (Janiszewska, 2014; Pitalua, Jimenez, Vernon-
71 Carter, & Beristain, 2010). Drying temperatures ranging from 133 to 180°C have been used
72 to microencapsulate betalains from different sources (Gandia-Herrero, Cabanes, Escribano,
73 Garcia-Carmona, & Jimenez-Atienzar, 2013; Pitalua, Jimenez, Vernon-Carter, & Beristain,
74 2010; Robert, Torres, García, Vergara, & Sáenz, 2015; Saénz, Tapia, Chávez, & Robert,
75 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014). Good recovery and color stability
76 have been demonstrated for the betalains encapsulated with maltodextrin and xanthan gum
77 from beetroot extracts (K. Ravichandran, Palaniraj, Saw, Gabr, Ahmed, Knorr, et al., 2014).
78 Similarly, the high stability of maltodextrin-encapsulated purified betalains has been
79 demonstrated by HPLC, which showed bright yellow and purple colors of powders stored at -
80 20 and 4 °C (Gandia-Herrero, Cabanes, Escribano, Garcia-Carmona, & Jimenez-Atienzar,
81 2013). In contrast, there are no studies about microencapsulation of betacyanins extracted
82 from colored quinoa using spray-drying technology under optimal conditions.

83 The stability of microencapsulated betalain has been studied under accelerated conditions
84 (Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014).
85 The effect of cactus pear extract (pulp and ultrafiltered) on the stability of modified starch-
86 encapsulated betacyanins and betaxanthins at 60 °C demonstrated that pigment degradation
87 also followed a pseudo-first order kinetics of degradation with a constant rate from 3.3×10^{-3}
88 to $8.2 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$ (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014). Similarly,
89 betacyanin degradation in cactus pulp and extract encapsulated in maltodextrin also followed
90 a pseudo-first order kinetics at a rate between 1.02×10^{-2} and $1.28 \times 10^{-2} \text{ days}^{-1}$ at 60 °C
91 (Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009). These betalain stability studies have been carried
92 out using storage temperature and oxygen as accelerating factors, controlled by constant air

93 flow in a common forced-air oven. Betalain degradation has been monitored in batches by
94 spectrophotometric and/or chromatographic assays at different time intervals ranging from 44
95 to 180 days but the oxidative degradation of betalains cannot be monitored through oxygen
96 consumption in this system. However, a previous study has demonstrated a nearly one-to-one
97 stoichiometry between betanin and oxygen reaction in an aqueous solution using a galvanic
98 cell oxygen electrode (Attoe & von Elbe, 1984). Nevertheless, this analytical technique is not
99 applicable to solid samples like microencapsulated betalain and, to the best of our best
100 knowledge, there is no report on oxidative degradation of microencapsulated betalains
101 monitored through oxygen consumption.

102 The aim of this study was to evaluate the effect of different spray-drying conditions using a
103 face centered central composite design and to thereby establish the optimal spray-drying
104 conditions to produce maltodextrin-microencapsulated betacyanins extracted from colored
105 organic quinoa as well as to study their stability under accelerated conditions using an Oxitest
106 system.

107

108

109 **2. Materials and methods**

110 *2.1. Quinoa seed and betalain extraction*

111 Organic black quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) was provided by Coopain-Cabana
112 (<http://www.coopaincabana.com/index.php/products>), an organic whole foods company from
113 the Peruvian Altiplano region (Cabana, Puno, Peru). Sixty-seven grams of quinoa were
114 subjected to successive extractions with 1500 and 1000 mL of MilliQ ultrapure grade water
115 (<18.2 mΩ) in a magnetic stirrer (Velp, Italy) twice at 1500 rpm and room temperature for 1
116 h each time. Raw extract was centrifuged at 5000 rpm for 10 min at room temperature and
117 stored at -20°C until use.

118 *2.2. Microencapsulation of betalain from quinoa by spray-drying*

119 *2.2.1. Spray-drying process*

120 Betalain extracts were fed to a Buchi B-290 spray-dryer (Buchi, Switzerland) at a feeding
121 rate of 6.7 mL min⁻¹ (20% of total capacity of spray-dryer) and spray-dried at an inlet air
122 temperature (IAT) between 140 °C to 180 °C with an air flow rate (AFR) between 40 and 60
123 mm of height as measured by rotameter. Maltodextrin dextrose equivalent (DE) 10 (Sigma-
124 Aldrich, Spain) was used as the encapsulating agent at levels from 10 to 30 % w/w. The
125 spray- drying process was characterized by measuring the spray-drying yield determined as
126 % Yield = $(W_p/W_f) \times 100$, where W_p is the weight (g) of the collected product, and W_f is the
127 weight (g) of the non-solvent mass in the feed (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, & Yáñez-
128 Fernández, 2015).

129 *2.2.2. Experimental design*

130 The spray-drying process was performed using a face centered central composite design
131 ($\alpha = 1$) with 20 total runs and 6 center points to determine the experimental error. IAT,

132 AFR and maltodextrin concentration (MD) were used as independent variables (**Table 1**).
133 Absorbance at 540 nm of microencapsulates was used as a response variable that is related to
134 the microencapsulated betacyanin. Experimental data were fitted to a second order
135 polynomial [Eq. (1)] using a trial Design Expert 7.0 software (Stat-Ease, Inc., MN, USA).

$$136 \quad Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

137 Where: β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are the intercept, linear, quadratic and interaction coefficients,
138 respectively. The residual is denoted as ε .

139 Moreover, moisture content, color measurement and bulk density were also measured in each
140 of the betacyanin microencapsulates as described below (see section 2.4.1).

141 *2.2.3. Microencapsulated betacyanin content*

142 *2.2.3.1. Surface betacyanin*

143 Ten micrograms of microencapsulated betacyanin were treated with 500 μ L of a mixture of
144 ethanol and methanol (1:1 v/v) and agitated in a vortex at room temperature for 1 min before
145 centrifugation at 13,143g x 5 min (Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009). The absorbance at
146 540 nm was measured in the supernatant by microplate reader and used to calculate surface
147 betacyanin content using a molecular weight = 550.46 and molar extinction coefficient =
148 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas, Gonzalez, & Condezo-
149 Hoyos, 2015).

150 *2.2.3.2. Total betacyanin*

151 Sixty micrograms of microcapsules were treated with 3 mL of water, agitated in a shaker at
152 room temperature for 20 min and then centrifuged at 13,143g x 5 min (Saénz, Tapia, Chávez,
153 & Robert, 2009). The total absorbance at 540 nm was measured in the supernatant; total

154 betacyanin content of the microencapsulates was calculated (Eq. 2) using a molecular weight
155 = 550.46 and molar extinction coefficient = 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (F. Abderrahim, Huanatico,
156 Segura, Arribas, Gonzalez, & Condezo-Hoyos, 2015).

157
$$\text{Encapsulated betalain} = \text{Total betalain} - \text{Surface betalain} \quad (2)$$

158 *2.4. Characterization of the optimized microencapsulated powder*

159 *2.4.1. Water activity and moisture content*

160 Two-hundred micrograms, in triplicate, of the optimized microencapsulated product was used
161 to measure water activity at 25°C in an AquaLab Vapor Sorption Analyzer (Aqualab, WA,
162 USA). The moisture content of the microencapsulated betacyanin was gravimetrically
163 determined by drying 0.5 g of microparticles, in triplicate, at 70 °C until constant weight was
164 achieved (AOAC, 1996).

165 *2.4.2. Betacyanin and saponin quantification*

166 Betacyanin was extracted from optimized microencapsules as described above in section
167 2.2.3.2 and assessed as total betacyanins using a molecular weight = 550.46 and molar
168 extinction coefficient of 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas,
169 Gonzalez, & Condezo-Hoyos, 2015). Saponin was measured by a rapid adapted afrosimetric
170 procedure (Koziol, 1991). Briefly, one-hundred micrograms of microencapsules were put into
171 a screwcap test tube (160 mm longitude and 10.9 mm diameter) and shaken vigorously in 1
172 mL of water. Foam height was measured 5-10 s after shaking.

173 *2.4.3. Color measurement*

174 Ten grams of the powder was placed in a in a dish colorimeter and the L, a, b, h and C color
175 parameters of the CIELab space were measured in triplicate using a colorimeter (Konica
176 Minolta Colorimeter CR-400, Japan).

177 *2.4.4. Bulk density and dissolution*

178 Microencapsulate bulk density was measured by weighing 0.6 g of sample and placing it into
179 a 10-mL graduated cylinder. A steady vibration was produced on a vibrator for 3 min and the
180 volume was then recorded and used to calculate bulk density as g/mL (Cai & Corke, 2000).
181 The dissolution was carried out by adding 0.4 g of microencapsules to 10 mL of distilled
182 water and the mixture was stirred in a 50-mL glass beaker with a magnetic stirrer at 892 rpm
183 and a stirring bar measuring 2 mm x 7 mm. The time required for complete dissolution of
184 microencapsules was measured (Negrão-Murakami, Nunes, Pinto, Murakami, Amante,
185 Petrus, et al., 2017).

186 *2.4.5. Particle size and morphology*

187 The particle size and structure of the optimized spray-dried microcapsules were evaluated
188 using a scanning electron microscope (Philips XL30 S-FEG, SEMTechSolutions, USA)
189 operated at 20 kV. The specimens were coated through a sputtering process with a chromium
190 layer 15 nm thick (Q150T-S, Quorum Technologies, UK). The diameter of three-hundred-
191 fifty particles was manually analyzed by ImageJ software (<https://imagej.net/Downloads>).

192 *2.4.6. Accelerated storage stability*

193 An oxidation test reactor Oxitest (Velp Scientifica, Italy) was used to evaluate the storage
194 stability of optimized microencapsules under the effects of two accelerating factors,
195 temperature set at 80° and 90°C, and oxygen pressure set at 6 bars. Two grams of
196 microencapsules were put into reactor chambers and oxygen pressure was acquired for 72 h

197 every 1 minute using OxiSoft Software (Velp Scientifica, Italy). At the accelerated initial and
198 final storage conditions, images were acquired of microencapsules using a smartphone
199 camera; Red (R), Green (G), Blue (B) and HSV values were measured with the free Android
200 app “On Color Measure” (<http://www.apkthing.com/tools/7570-on-color-measure.html>). The
201 Euclidean distance between two points (microencapsules, m and blank, b) was used to
202 calculate color differences, a measurement of betacyanin degradation (Eq. 3) (M.
203 Abderrahim, M. Arribas, & Condezo-Hoyos, 2016).

$$ED = \sqrt{(R_m - R_b)^2 + (G_m - G_b)^2 + (B_m - B_b)^2 + (H_m - H_b)^2 + (S_m - S_b)^2 + (V_m - V_b)^2} \quad (3)$$

204 Where, R_m , G_m , B_m , H_m , S_m and V_m = Mean R, G, B, H, S and V, respectively calculated
205 from microencapsules before and after being subjected to an accelerated storage condition.
206 R_b , G_b , B_b , H_b , S_b and V_b = Mean of R, G, B, H, S, and V, respectively calculated from blank,
207 a white color image.

208 2.5. Statistical analysis

209 Correlation analysis was used to determine the association between absorbance at 540 nm of
210 an aqueous solution of microencapsules and CIELab parameters. Face centered central
211 composite design and analysis was used to optimize the spray-drying process. Regression
212 analysis was carried out to estimate the rate of oxygen consumption in the accelerated storage
213 test and particle size distribution. The statistical analysis was performed in GrapPad Prism
214 (GraphPad Prism 6.1, San Diego, CA, USA), Design Expert 10 (Stat-Ease, Inc., MN, USA)
215 and EasyFit (Math Wave Technology, USA).

216

217 **3. Results and Discussion**

218 *3.1. Microencapsulation of betacyanins from quinoa by spray-drying*

219 A face centered central composite design was applied to evaluate the effect of the spray-
220 drying process (air inlet temperature and flow rate) and the formulation (maltodextrin DE 10
221 concentration) on response variables. Microencapsulated betacyanin, CIELab color, moisture,
222 bulk density and yield were measured as responses (**Table 1**). From a practical view point,
223 only encapsulated betacyanin was used to optimize the spray-drying process. This parameter
224 was measured as the absorbance at 540 nm, which is the maximal absorption wavelength of
225 colored quinoa aqueous extract and is related to its betacyanin content (**Supplementary**
226 **Figure 1**). Moreover, microencapsulated betacyanin is equal to the total betacyanin of the
227 microparticles because surface betacyanin was found to be zero; i.e., the spray-drying process
228 employed in the present study trapped the betacyanin of the microencapsules in the
229 maltodextrin matrix. This means that betacyanin encapsulation efficiency, a parameter
230 previously described, was 100% in each spray-drying experiment. This value was higher than
231 the 95.5% to 99.7% reported for microencapsulation of cactus pear extracts (Vergara,
232 Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014).

233 Microencapsulated quinoa betacyanin showed color lightness (**Supplementary Figure 2**), L
234 values from 83.00 ± 0.34 to 92.86 ± 0.10 , lower than those found for purple cactus pear
235 encapsulated with 10% maltodextrin ($L = 27.00\pm 0.85$) (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, &
236 Yáñez-Fernández, 2015). The L value found in the microencapsulated quinoa betalain was
237 related, in part, to the maltodextrin concentration; in fact, increasing the maltodextrin
238 concentration increased L values (Table 1). The highest L value has been found for
239 microencapsulated beetroot juice betalain in 12.5% maltodextrin (Janiszewska, 2014), but the
240 a and b values were different from those found here for the microencapsulated quinoa

241 betacyanin. Therefore, CIELab values can be influenced by the concentration of
242 microencapsulated betalain and even by the chemical structure of betalain, since a high
243 proportion of vulgaxanthin-I has been found in beet root juice (Janiszewska, 2014). In fact, in
244 microencapsulated quinoa betacyanin, the absorbance at 540 nm -directly related to
245 betacyanin content- was very highly correlated to color measurements with Pearson
246 correlation coefficients of -0.8706 ($p < 0.0001$), 0.8703 ($p < 0.0001$), 0.8608 ($p < 0.0001$) and
247 0.7336 ($p < 0.001$) for the L, a, C and h values, respectively. This opens the possibility of
248 evaluating the betacyanin concentration in quinoa and probably in other samples using non-
249 invasive image analysis. The concentration of betalain in the microencapsules can be
250 influenced by the betalain content of the extracts. For instance, the spray-drying
251 microencapsulation of betalain extract from cactus pear (*Opuntia ficus-indica* and *Opuntia*
252 *stricta*) produced completely different color CIELab values (L = 69.9 and 65.6; a = 17.2 and
253 34.7; b = -7.2 and 8.23 for *Opuntia ficus-indica* and L = 16.23-37.2, a = 17.26-40.9 and b =
254 6.26-15.46 for *Opuntia stricta*) (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, & Yáñez-Fernández, 2015;
255 Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014).
256 CIELab values found for microencapsulated organic quinoa betacyanin (**Table 1**) were nearly
257 the same as those reported by Vergara et al. (2014) and Otarola et. al. (2015).

258 The technological spray-drying parameters like moisture, bulk density and yield found in
259 microencapsulated quinoa betacyanin fell in the range of values found in previous studies.
260 Moisture level, ranging from 2.14% to 8.26% (**Table 1**) was similar to those found (1.87-
261 6.95%) for encapsulation of betalain from purple cactus pear in gelatin-maltodextrin by
262 spray- drying in a Buchi dryer at the IAT between 110°C and 140°C (Castro-Muñoz,
263 Barragán-Huerta, & Yáñez-Fernández, 2015) and amaranthus betacyanin encapsulation in
264 maltodextrin (1.95-6.80%) at IAT from 150 to 210°C. IAT is the most important factor
265 affecting the physicochemical properties of spray-dried powder. A higher IAT temperature

266 supplies more heat into the drying chamber thereby reducing the moisture content of the
267 spray-dried product (Cai & Corke, 2000; Shishir & Chen, 2017). In the same fashion, bulk
268 density of microencapsulated quinoa betacyanin (0.41-0.55, **Table 1**) was slightly lower than
269 described for encapsulated amaranthus betacyanin (0.52-0.67) (Cai & Corke, 2000). High
270 temperatures can influence particle porosity or fragmentation owing to a fast water
271 evaporation rate reducing the bulk density of the spray-dried powder (Fazaeli, Emam-
272 Djomeh, Kalbasi Ashtari, & Omid, 2012; Kha, Nguyen, & Roach, 2010). Microparticles of
273 quinoa betacyanin did not show any fragmentation under IAT between 140° and 180°C
274 (**Figure 2A-2B**). In agreement with our findings, microparticle fragmentation has been not
275 shown at a drying temperature of 180°C (Cai & Corke, 2000). Finally, the spray-drying yield
276 of quinoa betacyanins ranged from 17.66 to 43.01% (**Table 1**), which agrees with the 16.4%
277 yields reported for maltodextrin- encapsulated betalains from cactus fruit (Otálora, Carriazo,
278 Iturriaga, Nazareno, & Osorio, 2015) and that ranged between 15.5% and 71.5% in modified
279 starch (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014).

280 The face centered central composite design applied to quinoa betalain spray-drying with
281 maltodextrin DE 10 as encapsulating agent showed that the quadratic model was significant
282 ($p < 0.0001$) for microencapsulated betacyanin measured as total absorbance at 540 nm with
283 $R^2 = 0.9855$, adjusted $R^2 = 0.9724$ and predicted $R^2 = 0.8703$. At low (140 °C) and high (180
284 °C) IAT, the absorbance at 540 nm was lower than intermediate values for airflow between
285 40 mm (667 L/h) and 60 mm (1744 L/h) (**Figure 1A**). Drying temperatures ranging from
286 133°C to 144 °C have been reported as optimal for microencapsulation of betalain from
287 cactus pear at the lowest air flow (≤ 600 L/h) (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, & Yáñez-
288 Fernández, 2015; Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García,
289 & Robert, 2014). However, absorbance at 540 nm for microencapsulated quinoa betacyanin
290 was reduced below the optimal region at IAT = 180 °C (**Figure 1A**). Using amaranthus

291 betacyanin, Cai and Corke (2000) have demonstrated that a higher drying temperature (> 180
292 °C) increases betacyanin loss. In agreement with previous studies, increasing maltodextrin
293 DE 10 (10-30%) reduced absorbance at 540 nm (**Figure 1B and 1C**). For instance, increasing
294 the maltodextrin concentration (3-10%) reduced lycopene and total carotenoids in
295 watermelon juice powder (Oberoi & Sogi, 2015). The reported reduction in the concentration
296 of the encapsulated bioactive compounds has been associated with a high amount of
297 maltodextrin incorporated into the spray-dried sample. In contrast, an increase in lycopene
298 content in spray-dried pink guava juice powder was observed with higher maltodextrin
299 concentrations (10-20%), but there was a slight reduction from around a concentration of 17-
300 20% maltodextrin (Patil, Chauhan, & Singh, 2014). A plausible explanation for this
301 contradictory report is the improvement bioactive compounds stability produced by
302 increasing the encapsulating concentrations (Murali, Kar, Mohapatra, & Kalia, 2015). This
303 reduction in the degradation rate with increased proportions of maltodextrin has been
304 suggested to decrease the surface betacyanin in the microencapsules from the amaranthus
305 extract (Cai & Corke, 2000). Nevertheless, under the spray-drying conditions employed to
306 extract betacyanin from quinoa, zero levels of surface betacyanin were found in the
307 encapsulated product. On the other hand, the high drying air flow rate did not influence the
308 quinoa betacyanin extract (**Figure 1C**), although bulk density was lower (**Table 1**).
309 However, a lower drying air flow rate increases the droplet drying time compared to higher
310 flow rates (Goula, Adamopoulos, & Kazakis, 2004). Optimized spray-drying conditions for
311 quinoa betacyanin were predicted by a quadratic model as IAT = 165.1°C, drying air flow
312 rate (AR) = 47 mm (rotameter) and maltodextrin concentration (MD) = 10% (w/v) with an
313 absorbance at 540 nm equal to 0.444 (desirability of 0.9) (**Figure 1D**).

314 *3.2. Characterization of optimized betacyanins microencapsulated from quinoa extract*

315 *3.2.1. Water activity and moisture content*

316 The moisture and water activity of the optimized quinoa betacyanin microencapsulates
317 powder were 1.64 ± 0.08 % and 0.127 ± 0.006 , respectively (**Table 2**). These values were
318 lower than those found for microencapsulated pulp and ultrafiltered cactus pear extract
319 (moisture = 3.7-5.1% and water activity = 0.23-0.30), which were spray-dried at 133°C
320 (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014). Similarly low moisture (2.96 ± 0.03)
321 and water activity (0.25 ± 0.00) have been found for maltodextrin-microencapsulated cactus
322 pear betalain using maltodextrin as encapsulating agent at 140°C (Castro-Muñoz, Barragán-
323 Huerta, & Yáñez-Fernández, 2015). The differences observed in the moisture and water
324 activity levels of microencapsulated substances could be explained by the differences in the
325 air temperature used in spray-drying; in our optimal condition a high drying temperature (165
326 °C) was used on microencapsulated quinoa betacyanins. Previous studies have demonstrated
327 that moisture content and water activity of powder products decrease with an increase in IAT
328 (Cai & Corke, 2000). The water activity (0.148 ± 0.005) of powder from *hierba mate* extract
329 prepared by spray-drying at 160 °C was similar to that found in the present study, although a
330 higher moisture content (3.09 ± 0.08) has been reported despite maltodextrin DE 10 (30%
331 w/v) being used in the spray-drying (Negrão-Murakami, et al., 2017). Previous study has
332 demonstrated that higher maltodextrin concentrations decrease both moisture and water
333 activity of powder products (Shishir & Chen, 2017).

334 *3.2.2. Color measurement, betacyanin content, encapsulation yield and saponin content*

335 Color measurements for the optimized microencapsulated quinoa betacyanin (**Table 2**)
336 matched values reported by Vergara et al. (2014) for the microencapsulation of pulp and
337 ultrafiltered cactus pear extract in capsules in modified starch. Microencapsulated betacyanin
338 exhibited a redness grade ($a = 17.09 \pm 0.09$) with a brightness ($C = 349.64 \pm 0.15$) similar to
339 that found in microencapsulated cactus pear (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert,

2014). However, optimized microencapsulated quinoa betacyanin showed an L value (81.96 ± 0.44) higher than that of microencapsulated or ultrafiltered cactus pulp (69.9 ± 0.0 and 68.1 ± 0.6 , respectively) (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014) or microencapsulated clarified juice from purple cactus pear (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, & Yáñez-Fernández, 2015). This can be explained by the reportedly higher betacyanin content in pulp and ultrafiltered cactus (36.00 ± 0.03 mg betanin/100 g) (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014), whereas quinoa maltodextrin-microencapsulated betacyanin has lower betacyanin levels (19.95 ± 0.17 mg betanin/100 g). In fact, L values for microencapsulated quinoa betacyanin were negatively correlated with absorbance at 540 nm - related to its betacyanin content- (-0.8706 , $p < 0.0001$). These associations between betalain content and L values has been previously reported for red-colored quinoa (F. Abderrahim, Huanatico, Segura, Arribas, Gonzalez, & Condezo-Hoyos, 2015). In contrast, despite the betalain content (11.33 - 35.93 mg/100g) of microencapsulated products from purple cactus pear (*Opuntia stricta*) extract being similar to those optimized microencapsulated quinoa betacyanin, the L values were markedly different (17.16 - 37.20) (Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, & Yáñez-Fernández, 2015). On the other hand, this microencapsulated quinoa betacyanin contains a low amount of saponin (< 8 mg/100g), which, according to a report by Koziol (1991), should not be enough to confer a bitter taste on the powder product. In addition to betacyanin stabilization, the microencapsulation could further reduce the bitter taste of the microencapsulated quinoa betacyanin. The saponin content found in optimized microcapsules could contribute to producing a unique and multifunctional ingredient with several pharmacological properties. For instance, triterpene saponins from quinoa can induce apoptosis in HeLa cancer cells, as confirmed by flow cytometry DNA analysis (Kuljanabhadgavad, Thongphasuk, Chamulitrat, & Wink, 2008). Finally, the encapsulation yield (58.1%) optimized quinoa microencapsulation were lower than those reported for spray-

365 dried cactus pulp (65.3%) and ultrafiltered cactus (62.6%) (Vergara, Saavedra, Sáenz, García,
366 & Robert, 2014). Nevertheless, the level was higher than in cactus microencapsulates
367 (16.4%) (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno, & Osorio, 2015).

368 3.2.3. Dissolution

369 Quinoa betacyanin microencapsules showed a dissolution value of 349.50 ± 2.12 s, which
370 was slightly lower than previously reported for spray-dried concentrated *hierba mate* (385.05
371 ± 14.9 s) encapsulated in maltodextrin (30% w/v) DE 10.2 (Negrão-Murakami, et al., 2017).
372 The increase of maltodextrin concentration increased the dissolution time for
373 microencapsulated quinoa betacyanin to 446.5 ± 20.5 s and 537 ± 1.4 s for 10 and 30 % w/v
374 of maltodextrin. In agreement with our results, the reconstitution times were decreased at low
375 maltodextrin concentrations because the amount of maltodextrin reduces the solubility of the
376 powder (Oberoi & Sogi, 2015). Dissolution is a measurement of the reconstitution speed of
377 dried powder in water (Oberoi & Sogi, 2015).

378 3.2.4. Particle size and morphology

379 Quinoa betacyanin microcapsules at optimized spray-drying conditions (IAR = 165 °C, FAR
380 = 50 mm and 10% w/v maltodextrin DE 10) showed an equivalent diameter (no spherical
381 particle was obtained, see discussion below) in the range 3 to 10 μm with a mode of 4.4 μm
382 (**Table 2**). Particle size was slightly lower than those found for spray-dried powders of
383 betalains extracted from other sources like cactus, amaranthus and beetroot. Thus, Vergara et
384 al. (2014) found a microparticle size of 4.6 and 4.7 μm for microcapsules respectively
385 obtained from pulp and ultrafiltered cactus. In another study with cactus fruit, the
386 microcapsule sizes ranged between 6 and 51 μm (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno, &
387 Osorio, 2015). In addition, particle size ranged from 5 to 40 μm for microencapsulated
388 amaranthus betacyanin (Cai & Corke, 2000) and 11.4-12.8 μm for beetroot juice

389 microencapsulated in maltodextrin (Janiszewska, 2014). Contrarily to a unimodal distribution
390 previously found for betalain microcapsules from pulp and ultrafiltered cactus (Vergara,
391 Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014), the optimized microencapsulated quinoa
392 betacyanins showed a beta distribution model (**Figure 2C**). Air drying temperatures, feed
393 solid levels and the molecular weight of maltodextrin have been demonstrated to influence
394 microparticle size (Anandharamakrishnan & Padma Ishwarya, 2015; Cai & Corke, 2000;
395 Tonon, Brabet, Pallet, Brat, & Hubinger, 2009) and could explain the differences found in the
396 particle sizes.

397 Under optimized spray-drying conditions, all the microcapsules of quinoa betacyanins
398 encapsulated in 10% w/v of maltodextrin 10 DE were deformed, with extensive wrinkles and
399 a dented surface (**Figure 2A** and **Figure 2B**). Negrão-Murakami et. al. (2017) stated that this
400 morphology occurs when film formation is slow during the drying process for the atomized
401 droplets. The formation of indented surfaces has been attributed to the particle shrinkage
402 during the drying process, which can occur at a low or high IAT (Vergara, Saavedra, Sáenz,
403 García, & Robert, 2014). A similar deformed morphology has been observed in
404 microcapsules of cactus pear cultivar pigments with maltodextrin 10 DE (Saéñz, Tapia,
405 Chávez, & Robert, 2009) and amaranthus betalains also encapsulated in maltodextrin 10 DE
406 (Cai & Corke, 2000). An improvement in the sphericity of the particles has been shown when
407 a maltodextrin DE 25 was used as carrying agent for the encapsulation of betacyanins from
408 amaranthus (Cai & Corke, 2000). It has been suggested that a high molecular weight of the
409 encapsulating agent could prevent surface contraction and reduce the presence of rough
410 surfaces (Oberoi & Sogi, 2015). However, a deformed shape has been reported in spray-dried
411 *hierba mate* (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) encapsulated in maltodextrin with DE
412 equivalents of 10.1, 15 and 20 DE (Negrão-Murakami, et al., 2017). Therefore, some
413 underlying complex interactions between the core (betalain extract) and the wall

414 (maltodextrin) could influence the morphology of the microparticles obtained by spray-
415 drying technology.

416 *3.3. Accelerated storage stability of the optimized microencapsulated quinoa betalainins*
417 *using an Oxitest system*

418 The low degree of betalain glycosylation and acylation, and temperature, light, oxygen,
419 hydrogen peroxide, water activity, relative humidity, the presence of degrading enzymes such
420 as polyphenol oxidase, glucosidase, and metal ions have all been identified as factors that
421 influenced betalain stability (Azeredo, 2009; Khan, 2016). Different extrinsic factors like
422 high temperature, light, oxygen, hydrogen peroxide and relative humidity can reduce betalain
423 content (Azeredo, 2009; Khan, 2016). Temperature is the most important factor affecting
424 betalain stability during food processing and storage (Kavitha Ravichandran, et al., 2013), it
425 can produce isomerization, decarboxylation or cleavage that would result in a gradual
426 reduction of red color, and eventually the appearance of a light brown color in the betalain
427 extract (Azeredo, 2009; Fernandez-Lopez, Angosto, Gimenez, & Leon, 2013). Oxygen is
428 another extrinsic factor that affects betalain stability (Azeredo, 2009). In fact, the
429 simultaneous disappearance of betanin and oxygen from a solution has suggested overall
430 second-order reaction kinetics at 68°C, which occur at a rate suggesting a nearly one-to-one
431 stoichiometry for the above reaction (Attoe & von Elbe, 1984).

432 Temperature and oxygen have been used as factors for the study of betalain stability under
433 accelerated storage conditions of both liquid (Cejudo-Bastante, Hurtado, Mosquera, &
434 Heredia, 2014; Fernandez-Lopez, Angosto, Gimenez, & Leon, 2013; Güneşer, 2016) and
435 microencapsulated samples (Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009; Vergara, Saavedra,
436 Sáenz, García, & Robert, 2014). A forced-air oven has been used as a conventional system to
437 evaluate the behavior of microencapsulated betalains under accelerated conditions (Saénz,

438 Tapia, Chávez, & Robert, 2009; Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014).
439 However, in these systems oxygen levels cannot be regulated and controlled for comparison
440 with other stability studies. Moreover, betalain degradation cannot be monitored as oxygen
441 consumption (Attoe & von Elbe, 1984).

442 To the best of our best knowledge, this is the first time that the Oxitest system has been used
443 to evaluate the optimized microencapsulated quinoa betacyanins under accelerated
444 temperature and oxygen conditions (**Figure 3A**). Oxitest is an innovative system to perform
445 oxidative stability studies directly on whole samples that has been designed by Velp
446 Scientifica (Velp Scientifica SRL, Italy). Oxitest requires an oxidation test reactor for
447 chemical reactions occurring between pressured oxygen and sensitive components of raw
448 material under high temperature. The oxygen content in two chambers is continuously
449 monitored through a pressure sensor as a measurement of the oxidation of food components.
450 OxiSoft™ software allows online acquisition of oxygen pressure and temperature data and
451 estimation of the induction period as a measurement of oxidative stability for oxygen-
452 sensitive foods such as oils or those containing oils and fats (www.velp.com). The oxygen
453 consumption by the optimized microencapsulated betacyanin was increased with the heating
454 temperature in the Oxitest system. The slopes for the quinoa reduction of oxygen pressure
455 (measured between 0-72 h of heating) were -4.373×10^{-5} and -6.67×10^{-5} bar min⁻¹ at 80 °C
456 and 90 °C, respectively (**Figure 3B-2 and 3C-2**). Previous study has demonstrated that
457 betanin degradation and oxygen consumption occur at similar rates [slope = 0.96 estimated
458 by linear regression from experimental data reported by Attoe & von Elbe (1984)]; i.e., this
459 means the stoichiometry for the reaction between betanin and oxygen is nearly one-to-one
460 (Attoe & von Elbe, 1984). Therefore, we suggest that the slope of the oxygen consumption
461 found for microencapsulated betacyanin extracted from quinoa would reflect the betacyanin
462 degradation rate and could be a fast and comparable parameter for evaluating betalain

463 stability in the microencapsulated product. Oxygen consumption slopes at 80 (-4.373×10^{-5}
464 bar min^{-1}) and 90° C ($-6.67 \times 10^{-5} \text{ bar min}^{-1}$) found in the present study for quinoa
465 microencapsules were higher than the betacyanin degradation rate constant at 60 °C for
466 betalains in cactus pulp ($1.02 \times 10^{-2} \text{ days}^{-1} = 7.36 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$) and extract ($1.28 \times 10^{-2} \text{ days}^{-1}$
467 $= 8.9 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$) encapsulated in maltodextrin (Saénez, Tapia, Chávez, & Robert, 2009) and
468 for cactus pulp ($8.2 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1} = 5.7 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$) and ultrafiltered ($7.2 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1} = 5.7 \times$
469 10^{-6} min^{-1}) encapsulated product in a modified starch (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, &
470 Robert, 2014). The oxygen level used in the accelerated condition in the Oxitest (6 bar) and
471 forced-air oven together at the highest temperature of Oxitest (80 and 90 °C vs 60 °C) might
472 explain the differences found between the oxygen consumption and betacyanin degradation
473 rate constant. Therefore, Oxitest could be a rapid online system to evaluate pigment stability
474 in microencapsules under comparable, controlled and accelerated storage conditions. The
475 above oxygen consumption produced microcapsule decolorization (**Figure 3**). The Euclidean
476 distance was reduced from 357.3 ± 1.6 to 136.1 ± 3.3 at 80°C (61.9%) and from 337.4 ± 2.0
477 to 116.0 ± 3.5 at 90 °C (65.6%) after 72 h of heating (**Figure 3B-1 and Figure 3C-1**). As
478 found previously, the absorbance at 540 nm -directly related to betacyanin content- was
479 correlated to CIELab color, agreeing with the significant positive and negative linear
480 correlations found between betalains and color values in beetroot betalains during thermal
481 treatment (Güneşer, 2016).

482

483 **4. Conclusion**

484 This study optimized the maltodextrin-microencapsulation of betacyanin extracted from
485 black quinoa by spray drying. Two bioactive compounds, betacyanin and saponin, were
486 found in the optimized microencapsules. The stability of the microencapsulated betacyanin
487 can be evaluated by oxygen consumption using the Oxitest system. Maltodextrin-
488 microencapsulated quinoa betacyanin, which also contains a low saponin concentration,
489 could have unique health promoting properties.

490

491 **Conflict of Interest**

492 The authors declare that there is no conflict of interest.

493 **Acknowledgments**

494 The authors are indebted to Universidad Nacional de Juliaca (UNAJ) for the funding received
495 from the Canon Minero Project 2013, Resolution No. 086-2013-CO-UNAJ, Puno, Peru and
496 Dr. Javier Regadera from Universidad Autonoma de Madrid for his technical support in
497 scanning electron microscopy analysis as well as the Coopain-Cabana Cooperative for kindly
498 donating the quinoa.

499

500 **References**

- 501 Abderrahim, F., Huanatico, E., Segura, R., Arribas, S., Gonzalez, M. C., & Condezo-Hoyos,
502 L. (2015). Physical features, phenolic compounds, betalains and total antioxidant
503 capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian
504 Altiplano. *Food Chem.*, 183, 83-90.
- 505 Abderrahim, M., M. Arribas, S., & Condezo-Hoyos, L. (2016). A novel high-throughput
506 image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in
507 foods. *Talanta*, 152, 82-89.
- 508 Anandharamakrishnan, C., & Padma Ishwarya, S. (2015). Spray Drying Techniques for Food
509 Ingredient Encapsulation. In (pp. 285). NY: John Wiley & Sons, Ltd.
- 510 AOAC (1996). Official methods of analysis of AOAC International (16th ed.). USA:
511 Gaythersburg.
- 512 Attoe, E. L., & von Elbe, J. H. (1984). Oxygen involvement in betanin degradation.
513 *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 179(3), 232-236.
- 514 Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability – a
515 review. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 44(12), 2365-2376.
- 516 Cai, Y. Z., & Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus*
517 *Betacyanin* Pigments. *J. Food Sci.*, 65(7), 1248-1252.
- 518 Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B. E., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-
519 maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple
520 cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT - Food Sci. Technol.*, 62(1, Part 1), 242-248.
- 521 Cejudo-Bastante, M. J., Hurtado, N., Mosquera, N., & Heredia, F. J. (2014). Potential use of
522 new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*)
523 extracts under different pH and thermal conditions. *Food Res. Int.*, 64, 465-471.
- 524 Escribano, J., Cabanes, J., Jiménez-Atiénzar, M., Ibañez-Tremolada, M., Gómez-Pando, L.
525 R., García-Carmona, F., & Gandía-Herrero, F. (2017). Characterization of betalains,
526 saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*)
527 varieties. *Food Chem.*, 234, 285-294.
- 528 Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., & Omid, M. (2012). Effect of spray
529 drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry
530 juice powder. *Food Bioprod. Process.*, 90(4), 667-675.
- 531 Fernandez-Lopez, J. A., Angosto, J. M., Gimenez, P. J., & Leon, G. (2013). Thermal stability
532 of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 68(1),
533 11-17.
- 534 Gandia-Herrero, F., Cabanes, J., Escribano, J., Garcia-Carmona, F., & Jimenez-Atienzar, M.
535 (2013). Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as
536 powders of different colors. *J. Agric. Food Chem.*, 61(18), 4294-4302.
- 537 Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments
538 with potential application in functional foods. *LWT - Food Sci. Tech.*, 64(2), 645-649.

- 539 Goula, A. M., Adamopoulos, K. G., & Kazakis, N. A. (2004). Influence of Spray Drying
540 Conditions on Tomato Powder Properties. *Dry. Technol.*, 22(5), 1129-1151.
- 541 Güneşer, O. (2016). Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during
542 thermal treatment. *Food Chem.*, 196, 220-227.
- 543 Janiszewska, E. (2014). Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain.
544 *Powder Technol.*, 264, 190-196.
- 545 Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: A review. *Food Chem.*, 197, Part B, 1280-
546 1285.
- 547 Koziol, M. J. (1991). Afrosimetric estimation of threshold saponins concentration for
548 bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *J. Sci. Food Agric.*, 54, 211-219.
- 549 Kuljanabhadgavad, T., Thongphasuk, P., Chamulitrat, W., & Wink, M. (2008). Triterpene
550 saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry*, 69(9), 1919-1926.
- 551 Negrão-Murakami, A. N., Nunes, G. L., Pinto, S. S., Murakami, F. S., Amante, E. R., Petrus,
552 J. C. C., Prudêncio, E. S., & Amboni, R. D. M. C. (2017). Influence of DE-value of
553 maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage
554 stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *LWT -*
555 *Food Sci. Technol.*, 79, 561-567.
- 556 Oberoi, D. P. S., & Sogi, D. S. (2015). Effect of drying methods and maltodextrin
557 concentration on pigment content of watermelon juice powder. *J. Food Eng.*, 165,
558 172-178.
- 559 Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., & Osorio, C. (2015).
560 Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by
561 spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents.
562 *Food Chem.*, 187, 174-181.
- 563 Patil, V., Chauhan, A. K., & Singh, R. P. (2014). Optimization of the spray-drying process
564 for developing guava powder using response surface methodology. *Powder Technol.*,
565 253, 230-236.
- 566 Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E. J., & Beristain, C. I. (2010). Antioxidative
567 activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food*
568 *Bioprod. Process.*, 88(2), 253-258.
- 569 Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M., Gabr, A. M., Ahmed, A. R., Knorr, D., &
570 Smetanska, I. (2014). Effects of different encapsulation agents and drying process on
571 stability of betalains extract. *J. Food Sci. Technol.*, 51(9), 2216-2221.
- 572 Ravichandran, K., Saw, N. M. M. T., Mohdaly, A. A. A., Gabr, A. M. M., Kastell, A., Riedel,
573 H., Cai, Z., Knorr, D., & Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on
574 betalain content and antioxidant activity. *Food Res. Int.*, 50(2), 670-675.
- 575 Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C., & Sáenz, C. (2015). The encapsulation of
576 purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as
577 encapsulating agents. *LWT - Food Sci. Technol.*, 60(2, Part 1), 1039-1045.

- 578 Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of
579 bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.*, 114(2),
580 616-622.
- 581 Shishir, M. R. I., & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of
582 fruit and vegetable juices. *Trends in Food Sci. Technol.*, 65, 49-67.
- 583 Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical
584 and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder
585 produced with different carrier agents. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44(10), 1950-1958.
- 586 Vega-Galvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martinez, E. A. (2010).
587 Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an
588 ancient Andean grain: a review. *J. Sci. Food Agric.*, 90(15), 2541-2547.
- 589 Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., & Robert, P. (2014). Microencapsulation of
590 pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability
591 during storage. *Food Chem.*, 157, 246-251.
- 592 Vieira da Silva, B., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Natural phytochemicals
593 and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry
594 and protected-delivery technologies. *Trends in Food Sci. Technol.*, 50, 144-158.
- 595 Vila, M. M. D. C., Chaud, M. V., & Balcão, V. M. (2015). Chapter 19 - Microencapsulation
596 of Natural Anti-Oxidant Pigments A2 - Sagis, Leonard M.C. In *Microencapsulation*
597 *and Microspheres for Food Applications*, (pp. 369-389). San Diego: Academic Press.
- 598 Vilcacundo, R., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Nutritional and biological value of quinoa
599 (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Curr. Opin. Food Sci.*, 14, 1-6.
- 600
- 601
- 602

Table Captions

603

604

605 **Table 1** Face centered central composite design for betacyanin microencapsulation from an
606 aqueous colored organic quinoa extract. The physical and chemical properties of the
607 microparticles are expressed as mean \pm SD (n=3).

608 **Table 2** Chemical and physical characteristics of the betacyanin from colored organic quinoa
609 microencapsulated by optimized spray-drying conditions. The values are expressed as mean \pm
610 SD (n=3), except for particle size which is expressed as mode.

611

612

613

614

Figure Captions

615

616

617 **Figure 1** Response surface and contour plot of the effect of spray-drying conditions including
618 inlet air temperature, air flow rate and maltodextrin concentration (10 DE) on the absorbance
619 at 540 nm as a measurement of microencapsulated betacyanin (A, B and C). Optimized
620 spray- drying contour region for inlet air temperature and air flow rate were identified with a
621 desirability of 0.9 (C).

622 **Figure 2** Scanning electron microscopy image of microencapsulated colored quinoa
623 betacyanin extracted in water encapsulated by spray-drying (A-B). Particle size distribution
624 of microcapsules was fitted to a beta model using EasyFit Software (C). Spray-drying was
625 carried out at optimal conditions (inlet air temperature = 165 °C, air flow = 47 mm and 10%
626 w/v of maltodextrin 10 DE), which were established by response surface methodology with a
627 face centered central composite design.

628 **Figure 3** Stability of optimized maltodextrin-microencapsulated betacyanins from colored
629 organic quinoa betalain under accelerated conditions using an Oxitest system (A). Oxygen
630 consumption was monitored at 80°C and 90 °C and estimated as slope by linear regression
631 analysis (B-1 and C-1). Betacyanin degradation was calculated as Euclidean distance before
632 and after heating. RGB and HSV values were measured with the free Android app “ON Color
633 Measure” and used to calculate the Euclidean distance. The values are mean \pm SD of
634 triplicate measurements.

Table 1

Run	Independent variable			Parameters								
	IAT (°C)	AFR (mm)	MD (%)	Encapsulated betacyanin ^b	CIELab color					Moisture (%)	Bulk density (g/mL)	Yield ^c (%)
					L	a	b	C	h			
1	160	50	30	0.114	91.89±0.98	11.26±0.42	-2.96±0.04	11.65±0.04	345.27±0.73	3.13 ± 0.03	0.47 ± 0.00	43.01
2	180	60	10	0.391	85.85±0.19	16.51±0.11	-2.70±0.04	16.71±0.09	350.71±0.18	8.26 ± 0.07	0.50 ± 0.01	19.95
3	140	50	20	0.178	89.14±0.52	13.70±0.24	-2.91±0.02	14.01±0.24	348.00±0.19	2.79 ± 0.06	0.47 ± 0.01	34.59
4	140	40	30	0.104	89.44±0.27	13.65±0.08	-2.99±0.03	13.97±0.08	347.67±0.15	5.56 ± 0.52	0.53 ± 0.02	29.82
5	160	50	20	0.181	88.40±0.25	14.02±0.45	-2.82±0.03	14.30±0.44	348.61±0.45	3.07 ± 0.08	0.51 ± 0.00	37.31
6	140	60	30	0.108	92.86±0.10	10.44±0.08	-3.00±0.02	10.86±0.08	344.00±0.05	5.13 ± 0.32	0.44 ± 0.00	39.27
7	180	40	10	0.435	83.00±0.34	19.30±0.10	-2.50±0.00	19.46±0.10	352.61±0.03	6.31 ± 0.09	0.50 ± 0.01	17.97
8	160	50	10	0.482	85.23±0.09	17.09±0.06	-3.02±0.03	17.36±0.06	349.94±0.08	5.79 ± 0.50	0.41 ± 0.00	21.36
9	160	60	20	0.209	89.92±0.24	12.83±0.12	-2.81±0.03	13.13±0.11	347.64±0.22	2.67 ± 0.01	0.42 ± 0.02	36.93
10	180	60	30	0.105	92.72±0.38	10.81±0.34	-2.99±0.01	11.21±0.33	344.56±0.51	7.96 ± 0.01	0.46 ± 0.00	42.68
11	160	50	20	0.185	88.97±0.07	13.22±0.08	-2.73±0.02	13.50±0.08	348.31±0.05	3.43 ± 0.14	0.47 ± 0.00	35.92
12	160	50	20	0.185	88.55±0.22	13.54±0.13	-2.86±0.01	13.83±0.12	348.08±0.10	3.92 ± 0.15	0.44 ± 0.01	35.26
13	160	40	20	0.193	88.25±0.67	14.92±0.24	-2.86±0.06	15.19±0.23	349.14±0.37	4.02 ± 0.01	0.47 ± 0.00	31.98
14	160	50	20	0.194	87.36±0.00	13.44±0.00	-2.96±0.00	15.57±0.00	350.21±0.00	3.43 ± 0.14	0.47 ± 0.00	36.40
15	180	50	20	0.189	87.25±0.22	15.46±0.14	-2.64±0.02	15.68±0.13	350.32±0.15	4.37 ± 0.26	0.55 ± 0.01	31.41
16	160	50	20	0.198	88.98±0.08	13.60±0.05	-2.86±0.02	13.89±0.05	348.13±0.08	2.14 ± 0.17	0.45 ± 0.01	35.22
17	160	50	20	0.186	88.36±0.25	13.72±0.10	-2.88±0.01	14.04±0.10	348.17±0.08	2.21 ± 0.04	0.44 ± 0.00	36.34
18	180	40	30	0.107	90.23±0.10	13.08±0.21	-2.86±0.01	13.38±0.21	347.65±0.21	3.07 ± 0.06	0.47 ± 0.01	36.93
19	140	60	10	0.413	86.16±0.12	16.21±0.02	-3.11±0.02	16.51±0.02	349.13±0.10	4.14 ± 0.26	0.48 ± 0.01	20.96
20	140	40	10	0.379	84.13±0.02	18.77±0.09	-3.03±0.01	19.01±0.09	350.83±0.06	3.16 ± 0.04	0.53 ± 0.02	17.66

^a Height indicated for spray dryer rotameter.

^b Mean of absorbance at 540 nm (n = 3). In all case RSD% was below 8%.

^c Calculated from weight of the collected product and weight (g) of the non-solvent mass in the feed. One hundred grams of aqueous solution containing betacyanin aqueous extract and maltodextrin were used.

Table 2

Parameters	
Microencapsulates	
Water activity	0.127 ± 0.006
Moisture (%)	1.64 ± 0.08
CIELab color	
L	81.96 ± 0.44
a	17.09 ± 0.09
b	-3.10 ± 0.05
C	17.37 ± 0.10
h	349.64 ± 0.15
Dissolution (s)	348.50 ± 2.12
Particle size ^c	
Mode (µm)	4.4
Asymmetry (µm)	1.1
Betacyanin content (mg/100 g) ^a	19.95 ± 0.17
Saponin content (mg/100 g) ^b	< 8
Spray-drying process	
Yield (%) ^d	58.1

^a Calculated from absorbance at 540 nm and using molecular weight = 550.46 and molar extinction coefficient of 60,000 L mol⁻¹ cm⁻¹.

^b Foam height equal 0.88 ± 0.04 mm. This saponin content correspond to sweet quinoa sample (Koziol, 1991).

^c Three-hundred fifty microparticles was manually counted using ImageJ. Experimental data was fitted to beta distribution model by EasyFit Software (MathWave Technologies, USA). Parameters of the beta model was used to estimate mode and asymmetry of microparticles.

^d Calculated from weight feed solution = 770 g containing 77 g of maltodextrin.

Figure 1

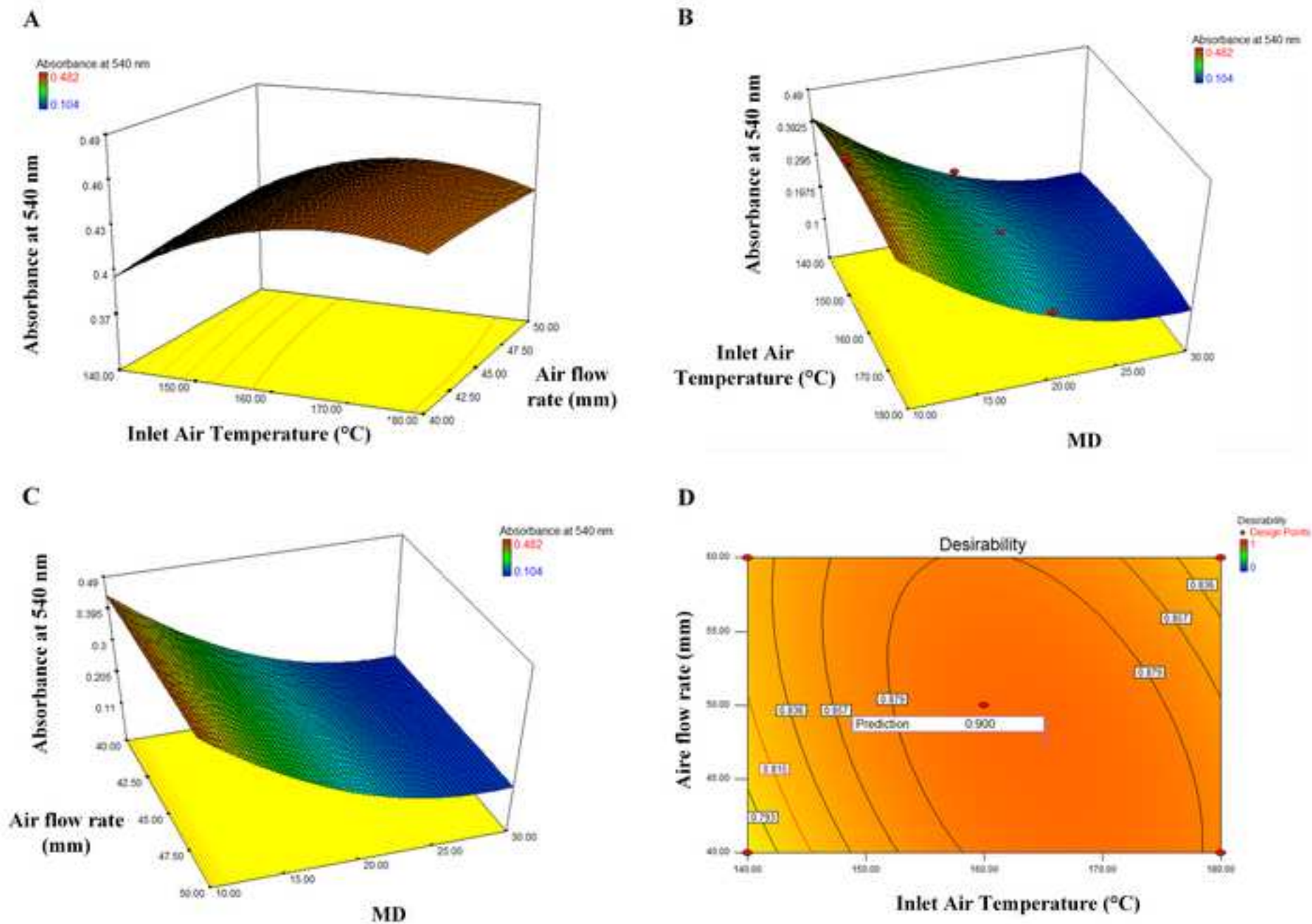
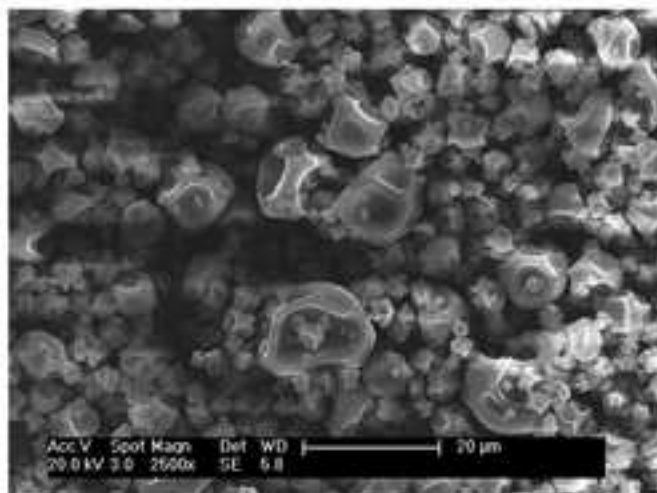


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2

A



B

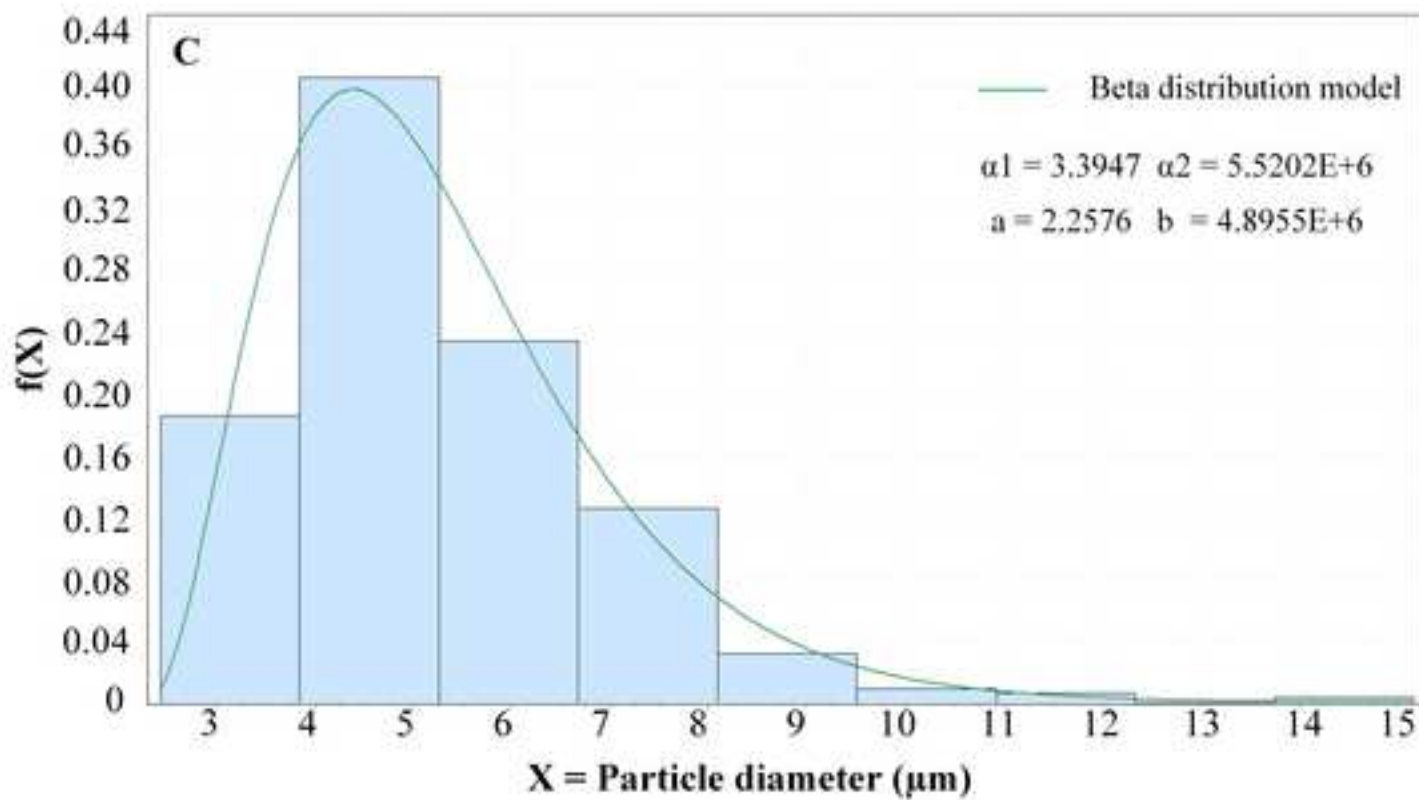
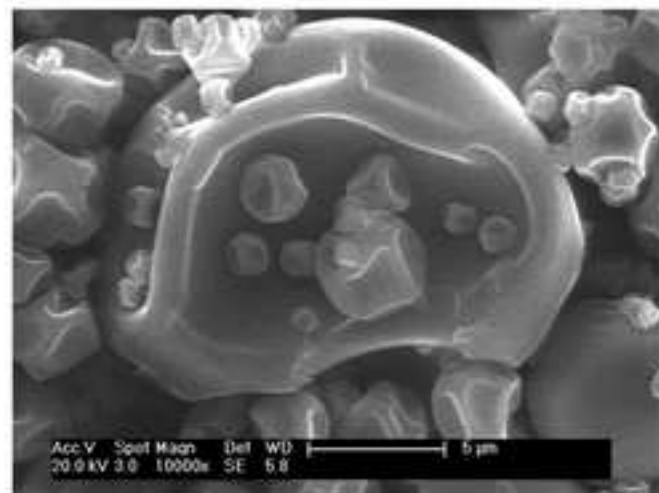


Figure 3

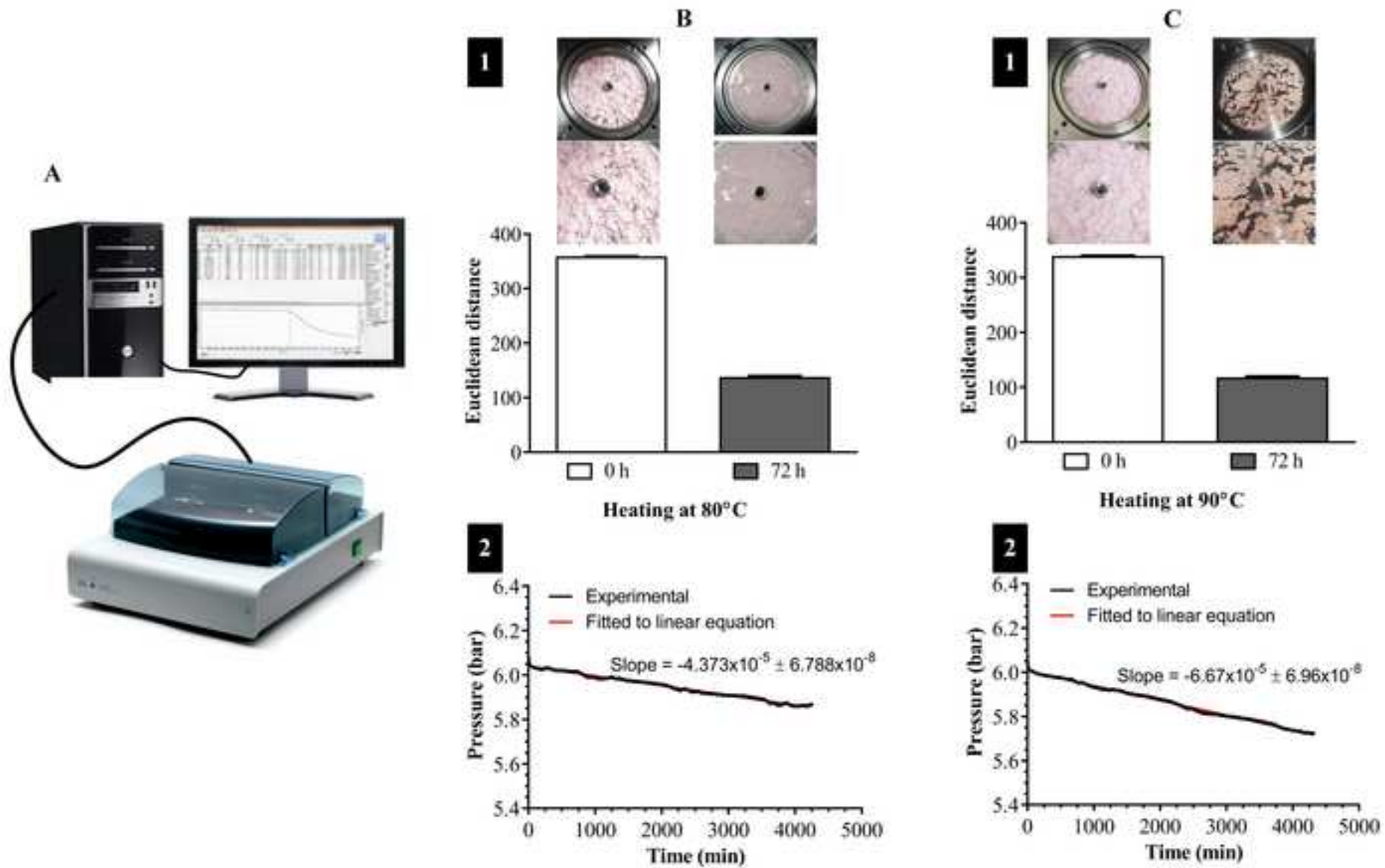


Figure 1

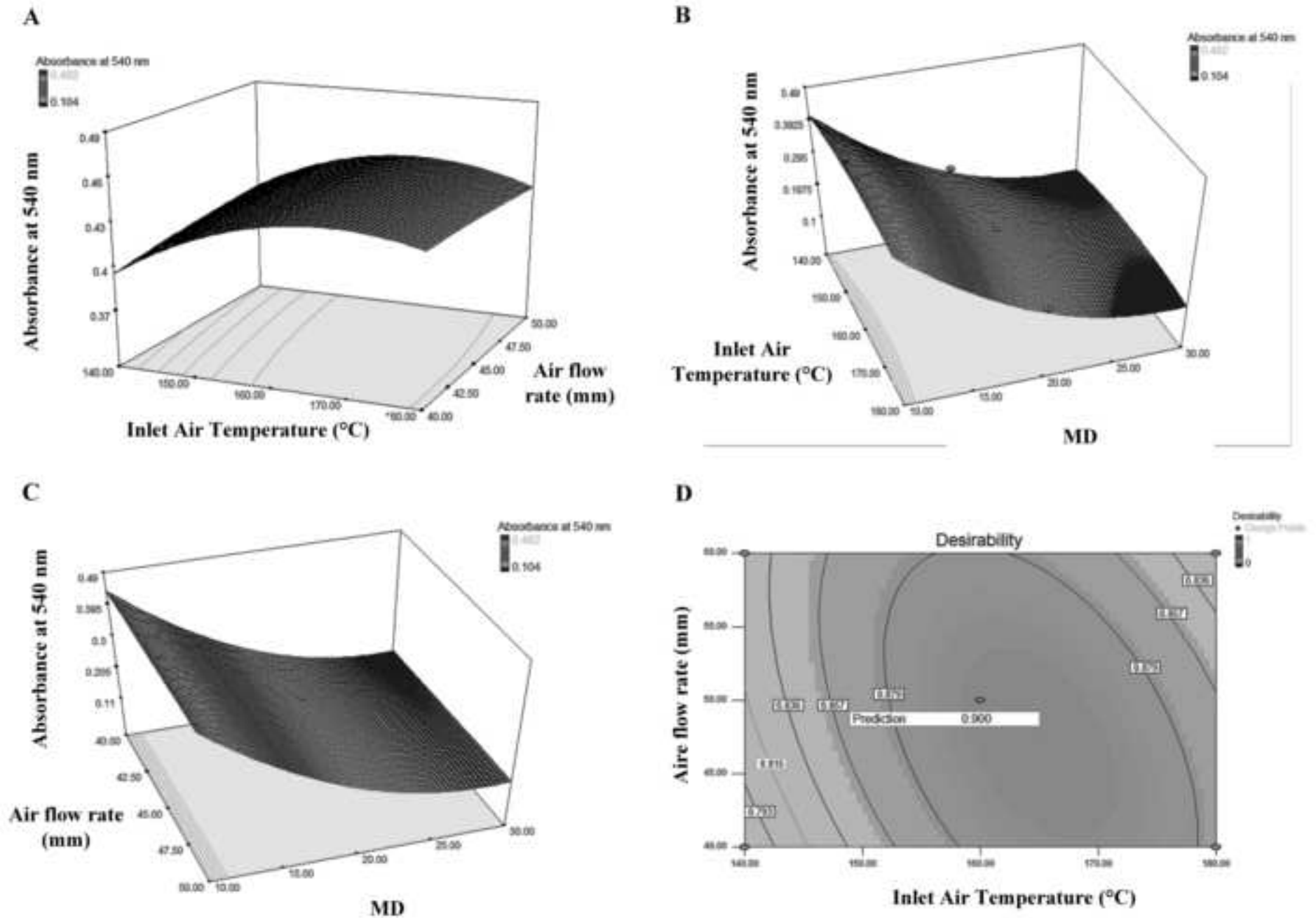


Figure 2

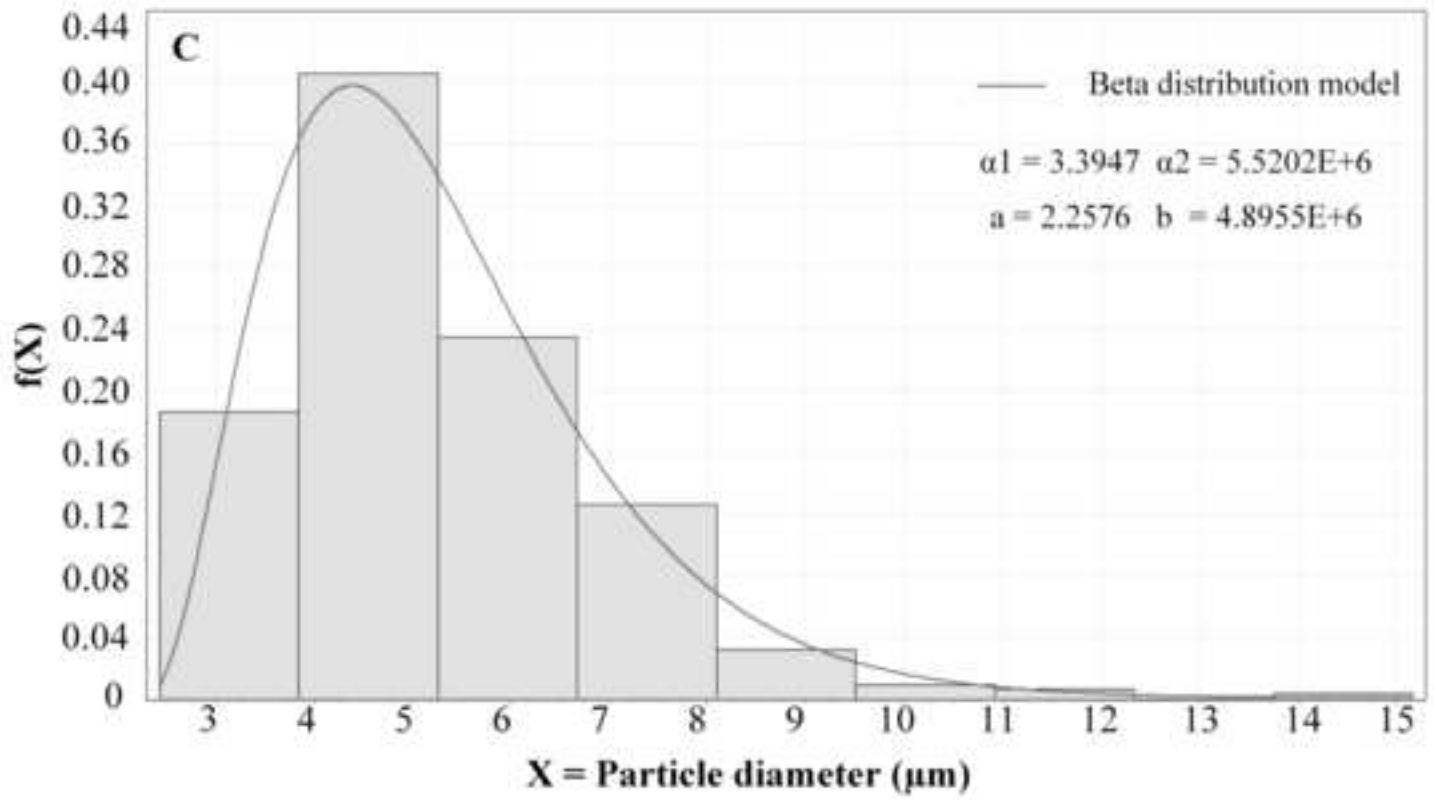
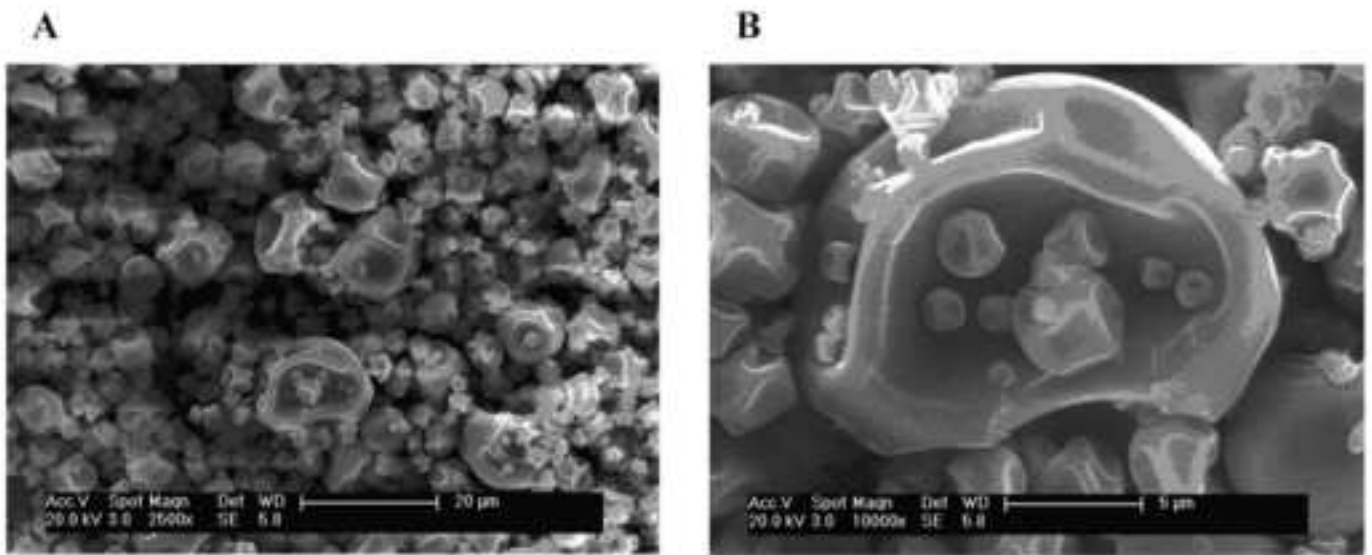
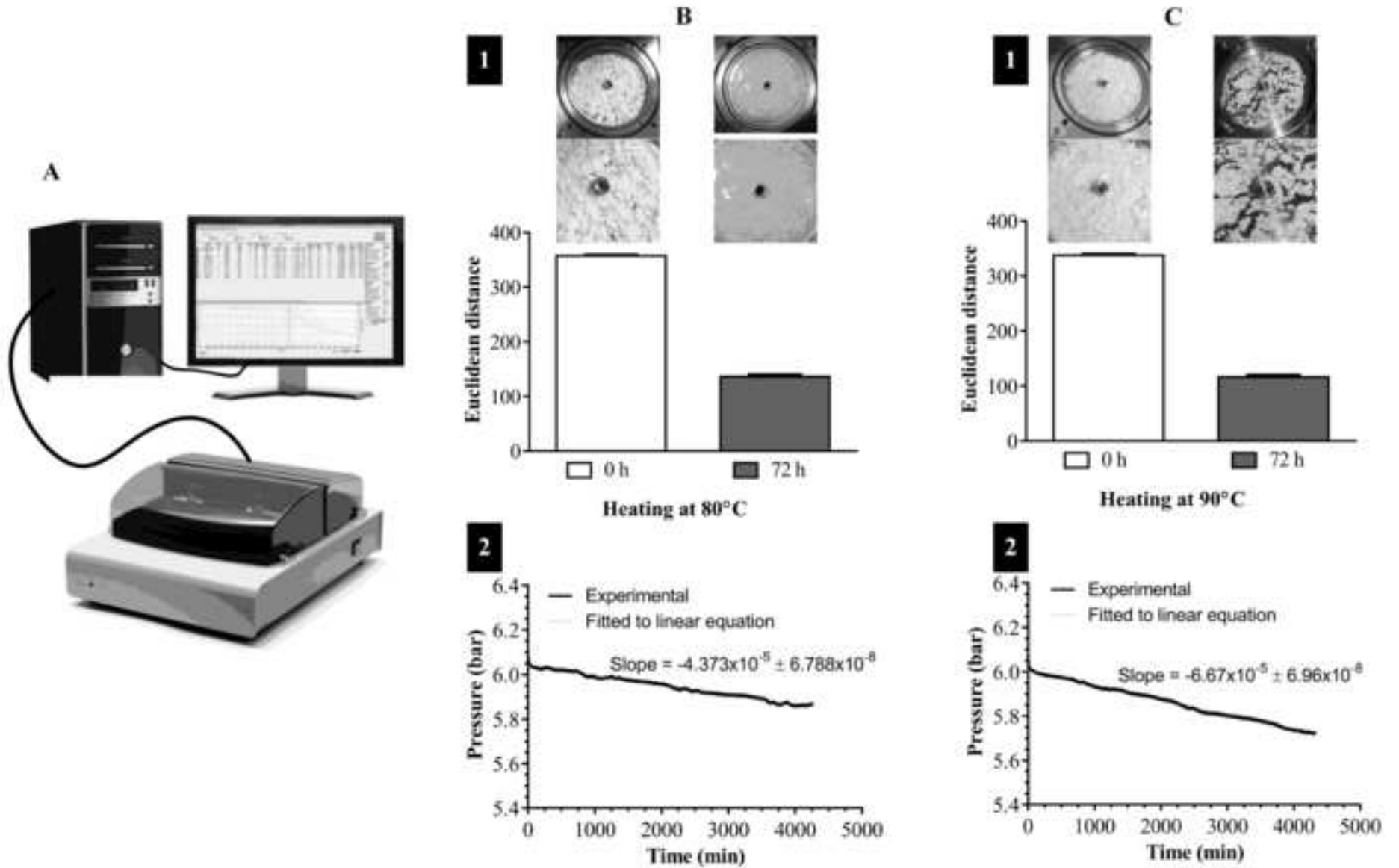


Figure 3



Supplementary Material 1

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary Figure 1.tif](#)

Supplementary Material 2

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary Figure 2.tif](#)