



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA
QUÍMICA

**ESTABILIDAD DE BETALAÍNAS EN UNA MEZCLA SECA PARA
BEBIDAS REFRESCANTES, A BASE DE PULPA Y EXTRACTO DE
TUNA PÚRPURA (*Opuntia ficus-indica*) MICROENCAPSULADAS**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

IVONNE DEL CARMEN CASTILLO GARRIDO

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. PAZ ROBERT CANALES
QUÍMICO**

**CO DIRECTORES DE TESIS
DRA. CARMEN SÁENZ HERNÁNDEZ
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**CRISTINA VERGARA HINOSTROZA
INGENIERO EN ALIMENTOS**

SANTIAGO - CHILE

2013

Proyecto FONDECYT N° 1110126

**ESTABILIDAD DE BETALAÍNAS EN UNA MEZCLA SECA PARA
BEBIDAS REFRESCANTES, A BASE DE PULPA Y EXTRACTO DE
TUNA PÚRPURA (*Opuntia ficus-indica*) MICROENCAPSULADAS**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Ingeniero
en Alimentos

DIRECTOR DE TESIS

Calificaciones

Paz Robert Canales
Químico, Dr.

PROFESORES CONSEJEROS

Jaime Ortiz Viedma
Ingeniero Ejecución en Alimentos, M.Sc.

María Angélica Larraín Barth
Ingeniero en Alimentos, Dr.

Santiago, Chile
2013

DEDICATORIA

A mis padres.

Por el apoyo que me han brindado siempre y durante todo mi periodo de formación como profesional, por su gran esfuerzo, por el amor incondicional que me entregan cada día y por sus consejos que me han permitido ser una persona de bien, motivándome siempre a vivir cada momento de mi vida y a cumplir todas las metas que me he propuesto.

Agradezco a Dios, quien dispuso que fueran parte de mi vida y por permitirme sentir este amor infinito que guarda mi corazón hacia cada uno de ustedes. Gracias por ser parte de mi felicidad y por el sacrificio que desinteresadamente han llevado a cabo siempre por nosotros, sus hijos.

A mis hermanos.

Por su amor incondicional, por los momentos de felicidad que me han entregado y por ser uno de mis motivos para sonreír.

A mis amigos.

Por el apoyo y la amistad brindada durante todos estos años de Universidad.

"Aprende a nacer desde el dolor y a ser más grande que el más grande de los obstáculos"

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración, participación y ayuda en el desarrollo de esta tesis a:

Doctora Paz Robert Canales y Cristina Vergara Hinostriza, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Gracias por el apoyo y la confianza que me entregaron durante todo el periodo de realización de esta tesis.

Doctora Carmen Sáenz Hernández, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

Proyecto FONDECYT N° 1110126.

Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile.

Departamento de Agroindustria y Enología, Universidad de Chile.

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCION.....	1
1. Antecedentes generales de la tuna púrpura (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....	2
2. Rutas de degradación de las betalaínas.....	5
3. Estabilidad de las betalaínas.....	7
4. Tecnología de membranas en la separación y concentración de betalaínas.....	9
5. Microencapsulación.....	10
6. Materiales encapsulantes.....	12
7. Aplicaciones de betalaínas en sistemas alimentarios.....	13
II. HIPOTESIS.....	15
III. OBJETIVOS.....	16
1. Objetivo general.....	16
2. Objetivos específicos.....	16
IV. MATERIALES Y METODOS.....	17
1. Lugar de Trabajo.....	17
2. Materiales.....	17
3. Métodos.....	17
ETAPA 1. Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P) y extracto ultrafiltrado (UF)	18
1.1. Análisis estadístico.....	19
ETAPA 2. Obtención y caracterización de micropartículas.....	19
2.1. Preparación de las soluciones para microencapsular.....	19
2.2. Secado por atomización.....	20
2.3. Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas.....	20
2.4. Análisis estadístico.....	21

ETAPA 3. Estabilidad de betalaínas en mezcla seca para bebida, adicionada con micropartículas de pulpa de tuna (P) y extracto UF con Capsul® y K-4484.....	21
3.1. Elaboración y caracterización de la mezcla seca para bebida refrescante	21
3.2. Caracterización de la mezcla seca.....	22
3.3. Estudio de la estabilidad de betalaínas en las mezclas secas para jugo durante el almacenamiento.....	23
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
ETAPA 1. Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P) y extracto ultrafiltrado (UF).....	24
ETAPA 2. Caracterización de las micropartículas de pulpa de tuna y extracto ultrafiltrado con Capsul y K-4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.....	26
2.1. Morfología de las micropartículas	30
ETAPA 3. Estabilidad de betalaínas en mezcla seca adicionada con micropartículas de pulpa (P) y extracto UF para bebida refrescante.	31
3.1. Caracterización de las mezclas secas.....	31
3.2. Estabilidad de betalaínas en las mezclas secas formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K durante el almacenamiento... ..	33
VI. CONCLUSIONES.....	35
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	36
VIII. ANEXOS	45

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Condiciones óptimas de elaboración de micropartículas de pulpa (P) y extracto ultrafiltrado (UF) con Capsul® y K-4484.....	19
Cuadro 2: Formulación de mezcla seca para bebida con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K para bebida refrescante.	21
Cuadro 3: Características físicas y químicas de la pulpa (P) y extracto ultrafiltrado (UF).....	24
Cuadro 4: Características físicas y químicas de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, de los sistemas de pulpa (P-C y UF-C) y extracto UF (UF-C y UF-K).	29
Cuadro 5: Características físicas y químicas de mezclas secas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, reconstituidas.	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de las betacianinas	4
Figura 2: Estructura química de las betaxantinas	4
Figura 3: Rutas de degradación de betanina e isobetanina	6
Figura 4: Mezcla seca para la cuantificación de betacianina.	22
Figura 5: Microfotografías de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas: P-C, P-K, UF-C y UF-K.....	30
Figura 6: Coeficientes de variación de betacianinas durante el tiempo de mezclado para la formulación de mezcla seca con micropartículas del sistema P-C.	31
Figura 7: Porcentajes de retención de Betacianinas en el tiempo a 30°C, en mezclas secas para bebida refrescante formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K	33
Figura 8: Porcentajes de retención de Betaxantinas en el tiempo a 30°C, en mezclas secas para bebida refrescante formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K	33
Figura 9: Curva de calibración de glucosa	45
Figura 10: Curva de calibración de ácido gálico.....	47

RESUMEN

La tuna (*Opuntia ficus-indica*) es una importante fuente natural de compuestos bioactivos, destacándose los polifenoles y las betalaínas (betacianinas y betaxantinas), que se presentan como una opción interesante para el desarrollo de alimentos funcionales y/o saludables, debido a las características antioxidantes y a la capacidad colorante que estos otorgan. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la estabilidad de betalaínas en una mezcla seca para bebida refrescante adicionada con micropartículas de pulpa de tuna púrpura (P) y extracto ultrafiltrado (UF). La P y UF se encapsularon por secado por atomización utilizando Capsul® y K-4484 como agentes encapsulantes.

Las micropartículas de los cuatro sistemas (P-C, P-K, UF-C y UF-K) se caracterizaron físico-químicamente y morfológicamente. El contenido de betacianinas y betaxantinas de los sistemas de micropartículas estudiados (P-C, P-K, UF-C y UF-K), mostró un rango de 0,343-0,361 mg betanina/g polvo y de 0,145-0,160 mg indicaxantina/g polvo, respectivamente. Se obtuvo una alta eficiencia de encapsulación para betacianinas y betaxantinas, con valores entre 99,1-99,6% y 98,3-99,3%, respectivamente.

Se estudió la estabilidad de las betalaínas en las mezclas secas adicionadas de micropartículas de los sistemas (P-C, P-K, UF-C y UF-K), almacenadas (20 semanas) en estufa a 30°C y oscuridad. La retención, tanto de betacianinas como de betaxantinas en las mezclas secas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K, alcanzaron valores entre 94-69% y 95-75%, respectivamente a las 20 semanas de almacenamiento a 30°C. La mezcla seca con micropartículas del sistema UF-K, presentó retenciones de betacianinas significativamente mayores respecto a P-K (efecto tipo de extracto) y UF-C (efecto tipo de agente encapsulante).

Proyecto FONDECYT N° 1110126

Palabras claves: Micropartículas, colorantes naturales, estabilidad de betalaínas.

ABSTRACT

The cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) is an important natural source of bioactive compounds, as polyphenols and betalains (betacyanins and betaxanthins). These compounds are an interesting option to design functional and healthy foods, due to its antioxidant properties and coloring capacity. The aim of this study was to determine the stability of betalains in a dry mix added of purple cactus pear pulp (P) and ultrafiltered extract (UF) microparticles.

P and UF were encapsulated by spray drying, using Capsul and K-4484 as encapsulating agent. Microparticles (P-C, P-K, UF-C and UF-K) were characterized morphology and physicochemically. The betacyanin and betaxanthin contents of P-C, P-K, UF-C y UF-K microparticles systems, ranging from 0.343 to 0.361 mg betanin/g powder and 0.145 to 0.160 mg indicaxanthin/g powder, respectively. A high encapsulation efficiency (> 98%) for betacyanin and betaxanthin were obtained, between 99.1-99.6% and 98.3-99.3%, respectively.

The stability of betalains in dry mix added of P-C, P-K, UF-C y UF-K microparticles were stored during 20 weeks, at 30°C and darkness. The retention of betacyanins and betaxanthins in the dry mixes reached values between 69-94% and 75-95%, respectively. The dry mix with microparticles of UF-K system, had betacyanins retention percentage significantly higher than P-K (type of extract effect) and UF-C (encapsulating agent effect).

Project FONDECYT N° 1110126

Keywords: Microparticles, natural colorants, betalains stability.

I. INTRODUCCION

El color es uno de los atributos más importantes de los alimentos, considerado como un indicador de calidad y un factor determinante en su aceptación. En la actualidad colorear los alimentos es una práctica común, ya sea para resaltar, recuperar o uniformar el color original, debido a que durante el procesamiento y/o almacenamiento muchos alimentos son susceptibles a perder color.

En la industria se dispone de colorantes naturales y artificiales, sin embargo, ha habido un creciente interés en el desarrollo y uso de pigmentos naturales desde que las regulaciones oficiales en EEUU y UE han restringido el uso de colorantes sintéticos como aditivos, debido a sus posibles efectos cancerígenos (Tsuda *et al.*, 2001). Los colorantes naturales tienen muchas ventajas en comparación a los artificiales, en ensayos toxicológicos, se ha demostrado que un 42,11% de los colorantes naturales y un 7,14% de los colorantes artificiales, se pueden utilizar con IDA sin restricción. Al comparar los valores de toxicidad aguda, bajo el parámetro de DL₅₀, en general éstos son más bajos para los artificiales, es decir, cantidades menores tienen un efecto letal sobre el 50% de los grupos de prueba (Parra, 2004).

En el caso particular de los colorantes rojos, el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile sólo acepta la utilización de betanina (rojo de betarraga), carmín de cochinilla y eritrosina (RSA, 2011). En este contexto, las betalaínas se presentan como una alternativa de colorantes rojo-púrpura. Sin embargo, existen pocas fuentes de betalaínas en la naturaleza, sólo se presentan en la betarraga, el amaranto, la acelga roja y algunas cactáceas como la tuna (*Opuntia* sp), pitaya (*Stenocereus* sp.) y pitahayas (*Hylocereus undatus*) (Sáenz, 2006; Castellar *et al.*, 2003; Piattelli y Minale, 1964).

Para que las betalaínas se utilicen como colorante natural y pigmento antioxidante en alimentos, se deben estabilizar, siendo la tecnología de encapsulación una herramienta que permite proteger activos como las betalaínas, de su interacción

con otros componentes del alimento o bien para controlar su liberación (Yáñez *et al.*, 2005). En este contexto, esta investigación está enfocada a mejorar la estabilidad de betalaínas mediante el uso de la tecnología de microencapsulación, como es el secado por atomización, para su posterior utilización en aplicaciones industriales (Desai y Park, 2005).

1. Antecedentes generales de la tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*)

La tuna es la fruta del nopal, una planta arbustiva que pertenece a la familia Cactácea, género *Opuntia* y se caracteriza por su anatomía y morfología adaptada a condiciones de fuerte estrés ambiental (zonas áridas) (Sáenz, 2006). En el mundo se conocen aproximadamente 300 especies, las que son originarias de México, y están presentes en todo el continente americano, desde el norte de Canadá hasta el sur de Chile, también en Sudáfrica y países de la cuenca del Mediterráneo (Butera *et al.*, 2002; Sáenz, 2006). La especie más común es *Opuntia ficus-indica* que se caracteriza por tener frutos dulces, jugosos, de distintos colores (púrpura, rojo, naranja o amarillo), con abundante pulpa, con numerosas semillas y cáscara generalmente delgada, cubierta de pequeños grupos de espinas (Sáenz, 2006).

Tanto los frutos como los cladodios o paletas de la planta son fuente de componentes bioactivos, entre los que destacan la fibra dietética que incluye hidrocoloides como los mucílagos, pigmentos de diversos colores como las betalaínas y en menor proporción carotenoides, minerales como calcio y potasio, vitaminas, como la vitamina C, aminoácidos libres (en particular prolina, glutamina y taurina) y polifenoles (Stintzing *et al.*, 2001). Todos estos compuestos son apreciados desde el punto de vista de una dieta saludable y también como ingredientes para el diseño de nuevos alimentos (Sáenz, 2004).

La tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) es una de las pocas fuentes de betalaínas en la naturaleza, por lo tanto es una atractiva alternativa para obtener colorantes naturales, otorgando beneficios a la salud a través de su capacidad

antioxidante (Stintzing y Carle, 2004; Tesoriere *et al.*, 2005). La pulpa se caracteriza por su alto pH, baja acidez, alto contenido de azúcar y delicado aroma.

Las betalaínas son compuestos hidrosolubles derivados del ácido betalámico y se clasifican en dos grupos, las betacianinas responsables de los colores rojo-púrpura y las betaxantinas responsables de los colores amarillo-naranja (Sáenz, 2006; Castellar *et al.*, 2003; Piattelli y Minale, 1964). Las betacianinas presentan el grupo 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), que puede o no estar glicosilado. Las betaxantinas presentan conjugación con aminoácidos o derivados de aminoácidos (Castellar *et al.*, 2003; Allegra *et al.*, 2005; Azeredo, 2008; Herbach *et al.*, 2006).

Las betalaínas poseen en su estructura un cromóforo (ácido betalámico), centro absorbente no saturado, que permite el estudio de éstos pigmentos por absorbancia en el espectro UV-Vis. Debido a su naturaleza orgánica, se caracterizan por presentar transiciones de electrones n o π al estado excitado π^* , las energías que se requieren para estos procesos conducen a peaks entre 200 y 700 nm (Skoog *et al.*, 2003). Las betacianinas presentan un máximo a 535 nm y las betaxantinas entre los 460 y 480 nm.

En la tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*), se han identificado dentro de las betacianinas, la betanina (Figura 1) y la isobetanina, en bajos niveles (Sáenz *et al.*, 2009) y en las betaxantinas, la indicaxantina (Figura 2) (Butera *et al.*, 2002; Fernández-López y Almela, 2001; Castellar *et al.*, 2003; Allegra *et al.*, 2005), las cuales se encuentran presentes tanto en la cáscara como en la pulpa del fruto (Sepúlveda *et al.*, 2003; Odoux y Domínguez López, 1996; Castellar *et al.*, 2003).

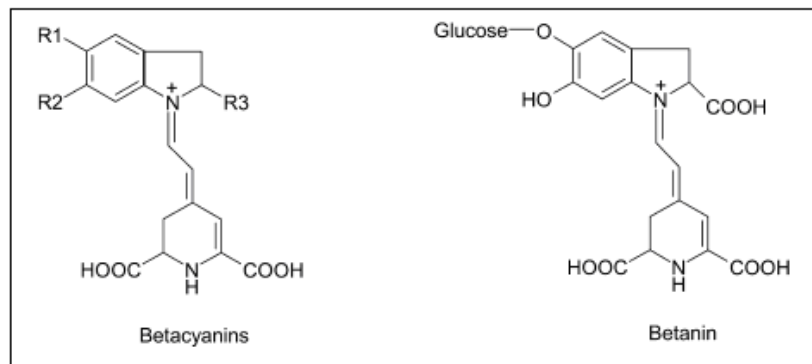


Figura 1. Estructura química de las betacianinas (Allegra *et al.*, 2005)

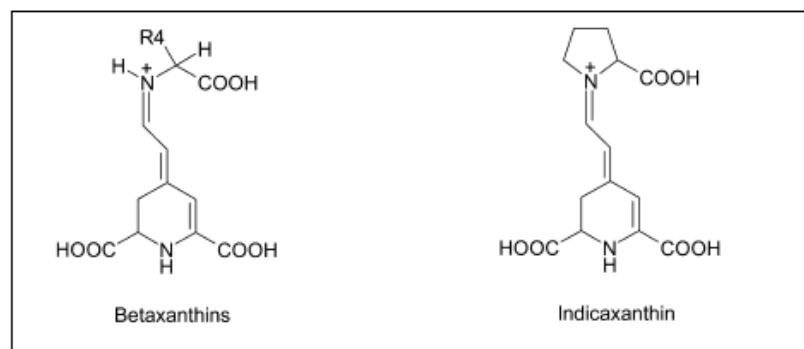


Figura 2. Estructura química de las betaxantinas (Allegra *et al.*, 2005)

En otras variedades de tuna púrpura, como *Opuntia undulata*, se ha identificado la presencia tanto de betacianina (betanina e isobetanina) como betaxantina (indicaxantina), mientras que en *Opuntia stricta* solamente se han detectado betacianinas (betanina e isobetanina) (Fernández-López y Almela, 2001; Castellar *et al.*, 2003).

En tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*), se han reportado contenidos de betacianinas y betaxantinas de 28,09 - 41,05 mg betanina 100g⁻¹ fruta fresca y 9,96 – 18,65 mg indicaxantina 100g⁻¹ fruta fresca (Sáenz *et al.*, 2009; Stintzing *et al.*, 2005), siendo afectado por factores como: el cultivar o variedad, madurez, clima y procedencia (Odoux y Domínguez-López, 1996; Stintzing y Carle, 2004; Sáenz, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2003).

Las betalaínas poseen actividad antioxidante en sistemas biológicos (Tesoriere *et al.*, 2005; Allegra *et al.*, 2005), que se atribuye a la presencia de un grupo fenólico y un grupo amino cíclico, capaces de donar electrones y átomos de hidrógeno estabilizando radicales libres (Kanner *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2008). Por otro lado, la naturaleza catiónica de las betalaínas favorecería la interacción de éstos pigmentos solubles en agua con moléculas polares de las membranas (Kanner *et al.*, 2001). Además, las características estructurales de las betalaínas (posición de glicosilación, posición de los grupos hidroxilos y el número de residuos hidroxilo y amino) influyen su actividad antioxidante (Kanner *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003 y 2005). Otras propiedades biológicas descritas para betalaínas son actividad antiulcerosa y hepatoprotectora en ratas (Galati *et al.*, 2003; Livrea y Tesoriere, 2006), acción antiinflamatoria en células endoteliales (Gentile *et al.*, 2004) y poder inhibitorio sobre la proliferación de células *in vitro* (Wu *et al.*, 2006).

La tuna púrpura además contiene polifenoles, con valores entre 660 y 909 mg/L de pulpa (Stintzing *et al.*, 2005; Sáenz *et al.*, 2009), a los cuales también se les ha atribuido propiedades antioxidantes (Heim *et al.*, 2002).

2. Rutas de degradación de las betalaínas

Las rutas de degradación de betalaínas como isomerización, descarboxilación, desglicosilación, deshidrogenación e hidrólisis, se han descrito principalmente para betanina e isobetanina (Herbach *et al.*, 2006). En la Figura 3 se muestran las posibles vías de degradación de estos compuestos.

- **Isomerización:** las betacianinas, específicamente la betanina, se isomeriza en el carbono C₁₅ a isobetanina, la cual presenta propiedades cromáticas idénticas a la betanina (Schwartz y von Elbe, 1983). El ácido betalámico y la indicaxantina (Wilcox *et al.*, 1965) son susceptibles a isomerización y la indicaxantina es también susceptible a epimerización en C₁₁.

- **Desglucosilación:** bajo condiciones fuertemente ácidas, altas temperaturas y presencia de β -glucosidasa, la molécula de glucosa puede separarse de la betanina, provocando un desplazamiento batocrómico cercano a 4 nm, obteniéndose un color rojo violeta profundo por la formación de una aglicona de menor estabilidad dada su mayor susceptibilidad a la oxidación (Herbach *et al.*, 2006).
- **Hidrólisis:** en tratamientos térmicos, la ruptura hidrolítica del enlace aldimina de las betalaínas se observó a pH superiores a 6. La hidrólisis de betanina disminuye la intensidad del color, debido a que la ruptura de la betanina genera ácido betalámico (amarillo brillante) y ciclo-Dopa-5-O- β -glucósido (incolores) (Herbach *et al.*, 2006). La ruptura del enlace aldimina es reversible con una condensación de base de Schiff a pH 6 (Huang y von Elbe, 1985 y 1987).

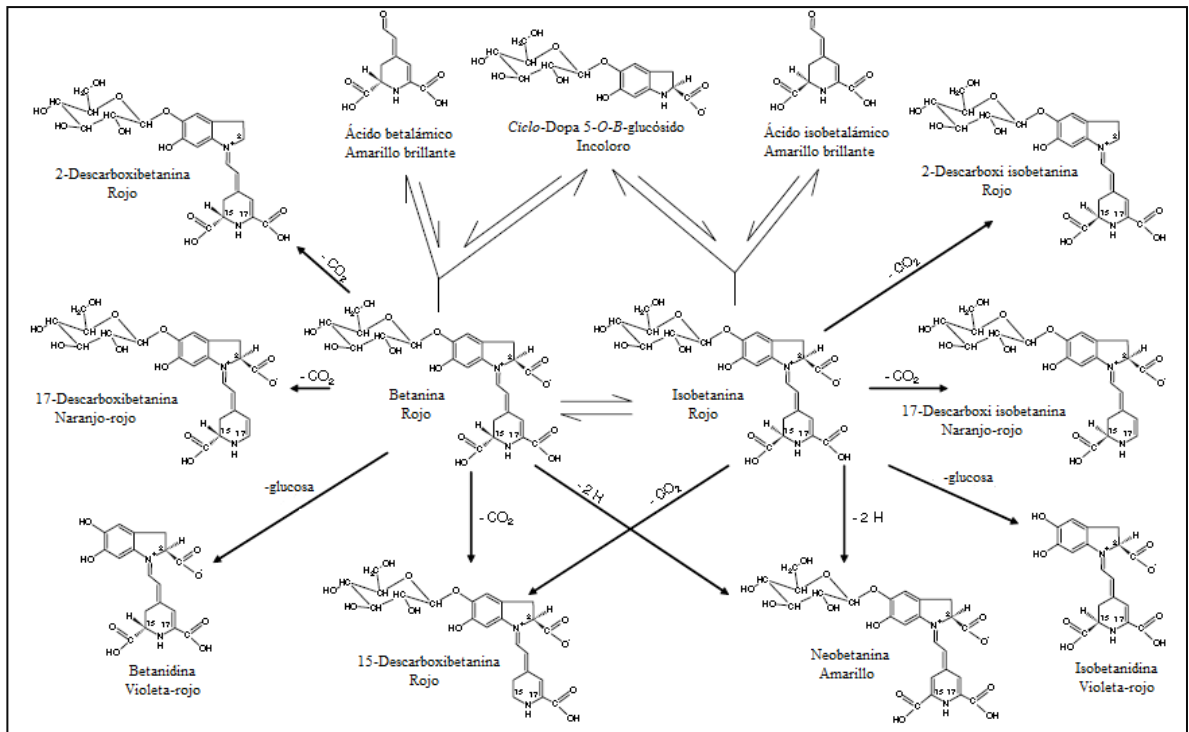


Figura 3. Rutas de degradación de betanina e isobetanina (Herbach *et al.*, 2006).

- **Descarboxilación:** teóricamente, la descarboxilación puede ocurrir en los carbonos C₂, C₁₅ y C₁₇ de las betacianinas y en los carbonos C₁₁ y C₁₃ de las betaxantinas. La descarboxilación produce un desplazamiento hipsocrómico, que puede explicarse por una disminución en la deslocalización de los electrones π (Herbach *et al.*, 2006). Varios estudios han observado que la betanina puede ser descarboxilada en las posiciones C₁₅ y/o C₁₇ (Herbach *et al.*, 2005).
- **Deshidrogenación:** estudios sobre el efecto de la deshidrogenación han mostrado que a partir de la isobetanina (color rojo) se produce neobetanina (14,15-dehidroxibetanina) que se caracteriza por un color amarillo (Alard *et al.*, 1985). La formación de neobetanina se ha confirmado en jugo de betarraga sometido a un tratamiento térmico bajo condiciones anaeróbicas (Herbach *et al.*, 2004).
- **Múltiples descarboxilaciones y deshidrogenaciones:** se ha observado que puede ocurrir más de un mecanismo de reacción, como en el caso de la neobetanina deshidrogenada bidescarboxilada (estructura indolizada) la que se produce durante el tratamiento térmico de soluciones de betaninas (Herbach *et al.*, 2005).

3. Estabilidad de las betalaínas

La estabilidad de las betalaínas ha sido estudiada por varios investigadores y se ha demostrado que éstas se ven afectadas por factores como el pH, actividad de agua, exposición a la luz, actividad enzimática y la temperatura, siendo éste último el principal factor que influye en la descomposición de betalaínas (Castellar *et al.*, 2003; Huang y von Elbe., 1985; Stinzling *et al.*, 2005; Herbach *et al.*, 2006).

- **Temperatura:** se puede considerar como el factor más importante en la estabilidad de las betalaínas durante el procesamiento y/o almacenamiento de

alimentos. En el tratamiento térmico, las betacianinas pueden ser degradadas por isomerización y/o descarboxilación. Si bien, el color de la betanina se mantiene, se produce un efecto hipsocrómico al desplazar el pick de absorción de 538 a 505 nm, lo que resulta en un color naranja-rojo (Azeredo, 2008). La deshidrogenación e hidrólisis de la betanina e isobetanina genera un color amarillo brillante, obteniéndose producto de la hidrólisis el ácido betalámico y ciclodopa-5-O-glucósido (Herbach *et al.*, 2006).

- **pH del medio:** la tonalidad del color brindado por las betalaínas no se ve afectada cuando el pH del medio oscila entre 3,0 y 7,0, rango de la mayoría de los alimentos. Por debajo de pH 3,0 el color cambia a violeta y por sobre pH 7,0 el color es más azulado, siendo mayor la intensidad a pH 9,0 (Sánchez, 2006). El pH óptimo para la máxima estabilidad de la betacianina y betaxantina en presencia de oxígeno está entre 5,5-5,8 (pH normal de la pulpa de tuna) y entre 5,0-6,0, respectivamente (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).
- **Luz:** existe una relación inversamente proporcional entre la estabilidad de las betalaínas y la intensidad de la luz (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). La degradación sigue generalmente una cinética de primer orden, oxígeno dependiente (von Elbe *et al.*, 1974; Herbach *et al.*, 2006). La susceptibilidad de betalaínas a la degradación inducida por la luz se explica por la absorción de la luz en el rango UV-Vis, que conduce a la excitación de los electrones del cromóforo de las betalaínas a un estado más energético.
- **Actividad de agua (a_w):** reconociendo la importancia del agua en muchas reacciones bioquímicas de degradación, no es sorprendente que la actividad de agua (a_w) se incluya entre los principales factores que afectan la estabilidad de las betalaínas y por lo tanto el color. La a_w es un factor importante a considerar, debido a que favorece la ruptura del enlace aldimina del pigmento (Herbach *et al.*, 2006), observándose una mayor estabilidad de la betanina cuando a_w está por debajo de 0,63. Las betalaínas en sus matrices naturales son más estables

que en soluciones puras, porque hay menos agua disponible para reacciones hidrolíticas favoreciendo otros mecanismos de degradación (Herbach *et al.*, 2005). Un aumento de la estabilidad se ha encontrado después de aplicar métodos para reducir la actividad del agua, como la concentración (Castellar *et al.*, 2003) y el secado por atomización (Cai y Corke, 2000).

- **Oxígeno:** las betalaínas reaccionan con el oxígeno molecular, produciendo la degradación del pigmento en solución saturada de aire. La cinética de degradación en atmósfera de aire sigue un modelo de primer orden, mientras que en ausencia de oxígeno se desvía del primer orden. Para aumentar la estabilidad de las betalaínas se deben utilizar atmósferas con bajos niveles de oxígeno. Estudios de almacenamiento de sistemas modelos con betalaínas (6 días a 15°C y pH 7), mostraron que en atmósfera con oxígeno la degradación del color aumentó un 15% con respecto a la atmósfera con nitrógeno (von Elbe *et al.*, 1974). Por otra parte, en soluciones calentadas de betanina (pH 4,75, 130 min, 15 °C) la retención aumentó desde un 54 a un 92% al utilizar bajos niveles de oxígeno (Huang y von Elbe, 1987).
- **Presencia de metales:** con un menor efecto que los factores anteriores, la presencia de algunos cationes metálicos, tales como hierro, cobre, estaño y aluminio aceleran la degradación de las betacianinas. El complejo metal-pigmento con hierro y aluminio, puede presentar un efecto batocrómico (desplazamiento hacia mayores longitudes de onda o de menor energía) (Azeredo, 2008). Sin embargo, en jugo de remolacha el efecto de los iones metálicos es menor en comparación con soluciones puras de betanina, debido a la presencia de agentes complejantes de metales en el jugo.

4. Tecnología de membranas en la separación y concentración de betalaínas

El desarrollo de la tecnología de membranas ha permitido ampliar las técnicas de filtración de líquidos con el propósito de separar y/o concentrar diversos

compuestos, entre ellos compuestos bioactivos y pigmentos. Esta técnica se basa en la transferencia de materia a través de una membrana que permite el paso selectivo de sustancias. El flujo de estas sustancias puede depender de diferentes fuerzas impulsoras, principalmente: la presión, concentración y potencial eléctrico. La selectividad permitirá enriquecer o empobrecer una corriente en una o varias sustancias (Reis y Zydney, 2007) y depende del tamaño de poro y de su afinidad química (Guizard, 1999). Entre estas técnicas de separación y concentración se encuentran la microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración (Jesús *et al.*, 2006).

- **Ultrafiltración:** es una técnica de separación que opera gracias a una diferencia de presión como fuerza impulsora, con un corte de masa molecular entre 1-500 kDa. Los solutos tales como azúcares, sales, aminoácidos y las moléculas de bajo peso molecular pasarán a través de la membrana, quedando retenidas las más grandes. Es por ello que, la principal aplicación de la ultrafiltración es la concentración, fraccionamiento y purificación de macrosolutos en solución acuosa, tales como proteínas y carbohidratos (Cassano *et al.*, 2010). En la ultrafiltración el tamaño de poros se expresa en términos del peso molecular de las sustancias que pueden ser retenidas por la membrana, teniendo como referencia el tamaño de las proteínas globulares (Ramírez, 2006).

Cuando se examina en forma detallada el mecanismo de transporte, es posible darse cuenta que estas membranas presentan igualmente un desempeño específico tal como una selectividad de separación entre iones monovalentes e iones multivalentes, así como también entre moléculas del mismo tamaño (Jesús *et al.*, 2006).

5. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos, sólidos, líquidos o gaseosos (antioxidantes, sabores, bactericidas, etc.) se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los

activos del medioambiente, de su interacción con otros componentes del alimento o bien para controlar su liberación (Yáñez *et al.*, 2005). La técnica de encapsulación ha permitido solucionar algunos problemas presentes en la aplicación de ingredientes y aditivos alimentarios, como por ejemplo, enmascarar sabores indeseados, reducir la volatilidad e incrementar la estabilidad de activos a condiciones ambientales adversas (Champagne y Fustier, 2007).

Diversos factores se deben considerar al momento de aplicar la tecnología de encapsulación, por ejemplo: cuál será la aplicación de las micropartículas, la composición de los ingredientes, el mecanismo de liberación, tamaño de partícula, forma física final, el costo, entre otros. De acuerdo a estas consideraciones se determina el método de encapsulación y el agente encapsulante más apropiado (Goud *et al.*, 2005).

En la actualidad existen diversos métodos para la elaboración de micropartículas. En general, estos métodos se pueden dividir en tres grupos (Goud *et al.*, 2005).

- Procesos físicos: secado por atomización, extrusión y lecho fluidizado.
- Procesos químicos: coacervación, atrapamiento en liposomas y gelificación iónica.
- Procesos físico-químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

De todos los métodos de encapsulación, el secado por atomización es ampliamente utilizado en la industria de alimentos, porque es un método económico y efectivo para proteger materiales (Wagner y Warthesen, 1995; Desobry *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2001, Minemoto *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 2003). En este proceso el material es atomizado en estado líquido, como solución o dispersión (con boquilla o disco giratorio), en forma de finas gotas en un flujo de aire caliente. Cuando las pequeñas gotas de líquido entran en contacto con el aire caliente, se obtiene instantáneamente un polvo, debido a la rápida evaporación del agua (Gharsallaoui *et*

al., 2007). Este método se puede utilizar en operaciones de recubrimiento de sólidos y líquidos porque a medida que se evapora el disolvente, el material de recubrimiento envuelve las partículas, lo que puede ser útil para enmascarar aromas y sabores y mejorar la estabilidad (López, 2010).

En este estudio, la encapsulación mejoraría la vida útil del agente activo preservando sus propiedades funcionales (De Vos *et al.*, 2010) y aumentando su estabilidad durante el almacenamiento. De esta forma, se dispondría de un colorante natural con propiedades saludables el cual podría adicionarse a alimentos como bebidas, helados, postres, dulces, mezclas secas, productos lácteos y productos cárnicos (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005; Obón *et al.*, 2009; Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

En la encapsulación de extractos de tuna (acuoso e hidroalcohólico) mediante secado por atomización se ha logrado mayor retención de betalaínas y polifenoles con el extracto acuoso de pulpa (Sáenz *et al.* 2009), sugiriendo que el mucílago de la pulpa ayuda al proceso de encapsulación de los compuestos bioactivos. La pulpa de tuna contiene un 3,8% de mucílago, compuesta por una fracción insoluble en cetrimide (44,3%) formada por ácido urónico (28%), xilosa, ramnosa, y galactosa, y una fracción soluble (15,6%) compuesta por ácido urónico (16%), arabinosa y galactosa. El mucílago es una mezcla compleja de polisacáridos (<50%), con estructura similar a las pectinas (Matsuhira *et al.*, 2006).

6. Materiales encapsulantes

En el área de alimentos se pueden utilizar diferentes tipos de agentes encapsulantes tales como carbohidratos (almidones de diferentes fuentes: papa, arroz, maíz, entre otros (Loksuwan, 2007), maltodextrina (Wagner y Wathersen, 1995; Desobry *et al.*, 1997), ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, goma arábiga, alginato de sodio, carragenina y quitosano (Souza *et al.*, 2005)), proteínas (Chen *et al.*, 2006) (gelatina (Robert *et al.*, 2003), caseinatos (Hogan *et al.*, 2001; Santinho *et al.*, 2002), aislado proteico de soya, suero de leche, zeína y aislado proteico de suero (Kim and

Morr, 1996; Dziezak, 1998) y grasas. Estos agentes encapsulantes muestran una función protectora sobre ingredientes sensibles contra el daño oxidativo (Robert *et al.*, 2003). Sin embargo, es importante tener en cuenta características como la flexibilidad, resistencia, permeabilidad, facilidad de aplicación y naturaleza hidrofóbicas o hidrofílicas de los mismos, ya que todos estos factores influirán en las características del producto final (Gibbs *et al.*, 1999).

Los agentes encapsulantes utilizados en este trabajo son Capsul® y K-4484. El Capsul® es un polvo fino blanquecino que corresponde a un almidón químicamente modificado derivado del maíz, que presenta tanto propiedades hidrofílicas como hidrofóbicas. Es soluble en agua fría (90%) y se solubiliza completamente a temperaturas sobre 82°C, tiene muy baja viscosidad y su pH varía entre 3 y 4. Entre las aplicaciones que posee se encuentran la alta eficiencia de encapsulación de sabores, fragancias u otros activos hidrofóbicos (National Starch & Chemical, 2001^a). El K-4484 es un polvo fino blanquecino que corresponde a una dextrina refinada obtenida a partir de almidón de tapioca. Presenta propiedades reológicas que lo hacen adecuado como fuente de hidratos de carbono para todo tipo de sistemas alimentarios líquidos, pero también en aplicaciones para el recubrimiento y formación de películas. El K-4484 presenta una buena solubilidad a bajas temperaturas otorgando estabilidad a la solución y presenta muy baja viscosidad a altas temperaturas en comparación con almidones espesantes normales (National Starch & Chemical, 2001^b).

7. Aplicaciones de betalaínas en sistemas alimentarios

Los estudios de aplicación de extractos de tuna encapsulados en alimentos son escasos. Algunos trabajos se han enfocado principalmente en la adición de micropartículas de pulpa o extractos de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) en yogur (Tapia, 2007; Torres, 2008; Alfaro, datos no publicados¹) y Obón *et al.* (2009) aplicaron un colorante obtenido de jugo de *Opuntia stricta* en un yogur y bebida refrescante.

¹ Tesis Magister en Ciencias Agropecuarias, M. Prod. Agro. Francisco Alfaro. Universidad de Chile.

Los alimentos mantuvieron un alto porcentaje de retención de betalaínas y un color púrpura intenso durante todo el periodo de estudio (30 días a 5°C).

En este contexto, estudiar la estabilidad del color en una matriz alimentaria es importante para su aplicabilidad industrial. De acuerdo a estos antecedentes este estudio se enfocó en evaluar la estabilidad de betalaínas en una mezcla seca para bebida refrescante formulada con pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) y extracto ultrafiltrado encapsulados.

II. HIPOTESIS

La degradación de las betalaínas desde micropartículas obtenidas de un extracto ultrafiltrado de tuna púrpura adicionadas a una mezcla seca para bebidas refrescantes, será menor con respecto a las micropartículas de pulpa de tuna.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar la estabilidad de las betalaínas en una mezcla seca para bebidas refrescantes adicionada con micropartículas de pulpa y extracto ultrafiltrado de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*).

2. Objetivos específicos

- Caracterizar la pulpa de tuna púrpura (P) y el extracto ultrafiltrado (UF) mediante análisis físicos y químicos.
- Elaborar y caracterizar las micropartículas de pulpa y extracto UF de tuna púrpura, obtenidas bajo condiciones óptimas¹ (Eficiencia de encapsulación de betalaínas, porcentaje de recuperación de betalaínas y rendimiento del proceso de encapsulación), mediante secado por atomización, utilizando como agentes encapsulantes K-4484 y Capsul®.
- Estudiar la estabilidad de las betalaínas en la mezcla seca para bebidas refrescantes adicionada con micropartículas de pulpa y extracto UF de tuna púrpura durante el almacenamiento en estufa.

¹ Tesis Doctorado Nutrición y Alimentos. Cristina Vergara. Universidad de Chile.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. Lugar de Trabajo

La parte experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de Alimentos del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y en el laboratorio de Productos Vegetales, del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas; ambos pertenecientes a la Universidad de Chile.

2. Materiales

- Tunas púrpuras (*Opuntia ficus-índica*), provenientes del Jardín de variedades de la Estación Experimental Antumapu de la Universidad de Chile, ubicada en la ciudad de Santiago (Latitud $-33^{\circ} 34' 10.24''$, Longitud $-70^{\circ} 38' 6.22''$). Cosecha 2012.
- Extracto ultrafiltrado (UF)¹ obtenido en membrana cerámica, multitubular de 7 canales, con tamaño de poro 1 kDa y área de filtración de $0,013 \text{ m}^2$, utilizando como alimentación el permeado de un proceso de microfiltración anterior.
- Agentes encapsulantes: Capsul® (C) (almidón modificado de maíz) y K-4484 (K) (dextrina de tapioca), obtenidos de National Starch.
- Ingredientes para la formulación de la mezcla seca para bebidas: sacarosa, ácido cítrico, sorbato de potasio, benzoato de sodio, ácido ascórbico, saborizante de frambuesa (Obón *et al.*, 2009).

¹ Comunicación personal: Las condiciones óptimas fueron definidas por Cristina Vergara en su tesis doctoral.

3. Métodos

La metodología para este proyecto se dividió en 3 etapas, las cuales se describen a continuación.

ETAPA 1. Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P) y extracto ultrafiltrado (UF)

La pulpa de tuna y el extracto se caracterizaron de acuerdo a:

- **Humedad, sólidos solubles y pH:** se determinaron de acuerdo al método descrito en AOAC (1996).
- **Parámetros de color (L*, a*, b*, C* y h°):** se determinaron usando un espectrofotómetro HunterLab modelo UltraScan Pro (USA). La pulpa se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm en una centrifuga modelo 5804 R Eppendorf AG (España) con el fin de extraer partículas en suspensión. Los parámetros de color se midieron en el sobrenadante.
- **Contenido de azúcares totales:** se determinó a través del método de Antrona, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK), a una longitud de onda de 620 nm (Osborne y Voogt, 1986) (Anexo 1).
- **Contenido de polifenoles totales:** se determinó por medio del método de Folin Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK) (Anexo 2).
- **Contenido de betacianinas y betaxantinas:** se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Stintzing *et al.* (2005) (Anexo 3), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK).

1.1. Análisis estadístico

Cada determinación analítica se realizó por triplicado. Se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA) entre P y UF para cada parámetro medido y se aplicó el test de Tukey.

ETAPA 2. Obtención y caracterización de micropartículas

Las micropartículas con pulpa (P)¹ y extracto ultrafiltrado (UF)² con Capsul® (C) ó K-4484 (K), se elaboraron bajo condiciones óptimas establecidas previamente, de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones óptimas de elaboración de micropartículas de pulpa (P) y extracto ultrafiltrado (UF) con Capsul® y K-4484

Sistema	Temperatura de entrada al secador (°C)	Extracto (%)	AE (%)	Relación (P ó UF)/AE
P-C	133	30	10	3:1
P-K	110	30	10	3:1
UF-C	133	30	12	2,5:1
UF-K	110	30	30	1:1

P-C: pulpa-Capsul, P-K: pulpa-K-4484, UF-C: ultrafiltrado-Capsul, UF-K: ultrafiltrado-K-4484, AE: agente encapsulante.

2.1. Preparación de las soluciones para microencapsular

Los agentes encapsulantes (10-30%), se disolvieron en agua destilada con agitación constante y temperatura (sobre 82°C para Capsul® y sobre 70°C para K-4484). Luego, se enfrió hasta 30°C (para evitar la degradación de las betalaínas) y se agregó la pulpa o el extracto ultrafiltrado (30%), finalmente se homogeneizó por 2 minutos con un homogeneizador Polytron PT 2100 a 11000 rpm (Cuadro 1).

^{1,2} Comunicación personal: Las condiciones óptimas fueron definidas por Cristina Vergara en su tesis doctoral.

2.2. Secado por atomización

Las soluciones resultantes de los sistemas (P-C, P-K, UF-C y UF-K) se alimentaron a un secador Büchi-290 (Suiza), con alimentación y flujo de aire en paralelo. Las condiciones de secado fueron: alimentación (5%), aspiración (100%), flujo de aire (600 L/h) y presión de atomización 5 bar.

2.3. Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas

La caracterización de los cuatro sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (P-C, P-K, UF-C y UF-K) se realizó de acuerdo a los parámetros que se describen a continuación:

- **Humedad:** los análisis se realizaron de acuerdo a la descripción realizada en la Etapa 1.
- **Morfología y tamaño de las micropartículas:** la estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, se analizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las muestras se cubrieron con oro/paladio utilizando un equipo Varian Vacuum Evaporator PS 10E y se analizaron utilizando un microscopio LEO 1420VP (LEO Microscopía Electrónica Ltd, Cambridge, Reino Unido) operado a 20 kV. Las imágenes se obtuvieron digitalmente utilizando un software EDS7424 (Oxford Instruments, Oxford, Reino Unido).
- **Contenido de betacianinas y betaxantinas totales y superficiales:** se cuantificaron por espectrofotometría de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.* (2005), utilizando un espectrofotómetro UNICAM UV/vis modelo UV 3 (USA), acoplado a un computador (Anexo 4).
- **Eficiencia de encapsulación (EE):** se calculó utilizando la ecuación 1.

$$(Ec.1) \quad \% EE = \frac{\text{Betacianinas o Betaxantinas totales} - \text{Betacianinas o Betaxantinas superficiales}}{\text{Betacianinas o Betaxantinas totales}} \times 100$$

- **2.4. Análisis estadístico**

Cada determinación se realizó por triplicado, posteriormente se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA) entre los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K, para cada parámetro medido y se aplicó el test de Tukey.

ETAPA 3. Estabilidad de betalaínas en mezcla seca para bebida, adicionada con micropartículas de pulpa de tuna (P) y extracto UF con Capsul® y K-4484.

3.1. Elaboración y caracterización de la mezcla seca para bebida refrescante

En el Cuadro 2, se presenta la formulación para la mezcla seca para bebida refrescante elaborada con micropartículas del sistema P-C, P-K, UF-C ó UF-K, utilizando como base la formulación descrita por Obón et al. (2009).

Cuadro 2. Formulación de mezcla seca para bebida con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K para bebida refrescante.

Ingrediente	g/L
Sacarosa	86
Micropartículas	9,8
Saborizante frambuesa	0,5
Ácido cítrico	1,5
Sorbato de potasio	0,18
Benzoato de sodio	0,14
Ácido ascórbico	0,02

Para la elaboración de las mezclas secas adicionadas con micropartículas de P y extracto UF para bebidas refrescantes, se utilizó el método de “mezcla en bolsa”. Se elaboró 500 g de mezcla seca adicionada de micropartículas del sistema P-C, para lo cual los ingredientes se tamizaron previamente (tamiz WWR, USA, ASTM E11

Specification, malla NO.50). La mezcla se efectuó de acuerdo a las cantidades relativas de cada ingrediente agregando en primer lugar el ingrediente en mayor cantidad (sacarosa) y luego cada ingrediente de menor a mayor cantidad, homogenizando por 2 minutos cada vez que se adicionó un ingrediente.

Para determinar el tiempo de mezclado de los polvos, se tomaron muestras en 5 puntos de la bolsa (Figura 4) cada 4 minutos durante 20 minutos, a cada una de ellas se le determinó el contenido de betacianinas.

El tiempo y técnica de mezclado se replicaron para la elaboración de las mezclas secas adicionadas de micropartículas de los sistemas P-K, UF-C y UF-K.



Figura 4. Mezcla seca donde se muestran los puntos de muestreo para la cuantificación de betacianina.

3.2. Caracterización de la mezcla seca

Cada formulación de mezcla seca (P-C, P-K, UF-C, UF-K) se caracterizó de acuerdo a los siguientes análisis:

- **Contenido de betacianinas y betaxantinas:** se cuantificaron por espectrofotometría de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.* (2005), utilizando un espectrofotómetro UNICAM UV/vis modelo UV 3 (USA), acoplado a un computador (Anexo 4a).
- **Solubilidad:** se determinó de acuerdo al método descrito por Cano-Chauca *et al.* (2005). Las mezclas secas (0,1 g en 10 mL) disueltas en agua destilada se

centrifugaron a 3000 rpm en una centrifuga Hettich ROTOFIX 32 (Alemania), durante 5 minutos. Finalmente, se transfirió una alícuota de 2,5 mL del sobrenadante a placas Petri, previamente pesadas y se secó en estufa a 105°C durante 5 horas. La solubilidad se calculó por diferencia de peso y se expresó en porcentaje.

- **pH:** se determinó de acuerdo con el método de la AOAC (1996), en un equipo pH meter CORNIG (USA).

3.3. Estudio de la estabilidad de betalaínas en las mezclas secas para bebida refrescante durante el almacenamiento.

El estudio de estabilidad se realizó para las mezclas secas formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K. En tubos abiertos (16x10 mm) se colocó 0,1 g de cada mezcla seca y se almacenaron en estufa de aire forzado y oscuridad a 30°C por cinco meses. Se tomaron muestras cada 7 días y a cada muestra se le realizó por triplicado las siguientes determinaciones:

- **Contenido de betacianinas y betaxantinas:** Se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Stintzing *et al.* (2005), utilizando un espectrofotómetro UNICAM UV/vis modelo UV 3 (USA), acoplado a un computador (Anexo 4c). Los porcentajes de retención de betacianinas y betaxantinas para cada sistema de mezcla seca estudiado, se expresaron en un gráfico %retención versus el tiempo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

ETAPA 1. Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P) y extracto ultrafiltrado (UF).

El Cuadro 3 muestra las características físicas y químicas de la pulpa de tuna púrpura (P) (*Opuntia ficus-indica*) y extracto ultrafiltrado (UF).

Cuadro 3. Características físicas y químicas de la pulpa (P) y extracto ultrafiltrado (UF).

Sistema/Parámetro	P (X ± DS)	UF (X ± DS)
Humedad (%)	84,4 ± 6,38 a	92,0 ± 0,50 a
pH	5,87 ± 0,03 a	5,03 ± 0,01 b
Sólidos solubles (°Brix) a 20°C	12,03 ± 0,29 a	8,1 ± 0,00 b
Azúcares totales (%)	15,7 ± 0,33 a	9,2 ± 0,30 b
Turbidez (NTU)	2453,4 ± 64,2 a	0,0 ± 0,0 b
Betacianinas (mg EB ⁽¹⁾ /L)	294,9 ± 3,67 a	247,9 ± 4,3 b
Betaxantinas (mg EI ⁽²⁾ /L)	94,8 ± 1,19 a	88,6 ± 1,16 b
Polifenoles totales (mg EAG ⁽³⁾ /L)	761,3 ± 18,1 a	659,7 ± 25,0 b
Parámetros de color ¹		
L	17,9 ± 0,04 b	17,8 ± 0,08 b
a*	51,8 ± 0,02 a	51,2 ± 0,08 b
b*	30,2 ± 0,09 a	29,9 ± 0,00 b
C*	60,0 ± 0,05 a	59,3 ± 0,10 b
h°	30,2 ± 0,07 a	30,3 ± 0,07 a

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; ⁽¹⁾ EB: expresado como equivalente a betanina; ⁽²⁾ EI: expresado como equivalente a indicaxantina; ⁽³⁾ EAG: equivalente de ácido gálico; NTU: unidad de turbidez nefelométrica; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3). Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (p < 0,05).

¹ Ver Anexo 5

El contenido de betacianinas y betaxantinas obtenidos en P fueron menores a los descritos por Stinzing *et al.*, (2005), de 431 mg/L y 195,8 mg/L, respectivamente y similares a los encontrados por Sáenz *et al.*, (2009) de 292,5 mg/L y 103,7 mg/L, respectivamente. Sin embargo, en todos los casos predominaron las betacianinas por sobre las betaxantinas, pigmentos característicos de frutos de tuna rojo-púrpura. El contenido de polifenoles en P (761,3 mg EAG/L) fue mayor al descrito por Stinzing *et al.* (2005) de 660 mg EAG/L y menor al descrito por Sáenz *et al.* (2009) de 909,47 mg EAG/L. Estas diferencias se pueden atribuir a factores como el cultivar o variedad, madurez, clima y procedencia, que afectan el contenido de betalaínas y polifenoles (Odoux y Domínguez-López, 1996; Stintzing y Carle, 2004; Sáenz, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2003).

Por otro lado, los valores de betalaínas para UF en este trabajo fueron mayores a los encontrados por Cassano *et al.*, en estudios realizados (2007 y 2010) para jugo de tuna púrpura ultrafiltrado con valores para betacianinas de 34,93 y 32,8 mg/L, respectivamente y para betaxantinas de 46,93 y 61,6 mg/L, respectivamente. El contenido de polifenoles en el UF (659,7 mg EAG/L) fue mayor a descrito por Cassano *et al.* (2010), de 552,17 mg EAG/L para la el mismo tipo de tuna sometida a ultrafiltración.

El contenido de sólidos solubles y azúcares totales en UF fue significativamente menor que P, mostrando el efecto de la utilización de membranas en la ultrafiltración de la pulpa. Los valores de sólidos solubles son menores que extractos ultrafiltrados de jugo de tuna púrpura obtenidos por Cassano *et al.* (2007 y 2010), de 14,1 y 10°Brix, respectivamente. Esto se debe a los diferentes tamaños de poro de membrana utilizada y a las condiciones propias en cada proceso de ultrafiltración.

El extracto UF obtenido presentó un contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) y polifenoles significativamente menor que P. Además correspondió a una solución clarificada (0 NTU) que a diferencia de P no contiene mucilagos.

ETAPA 2. Caracterización de las micropartículas de pulpa de tuna y extracto ultrafiltrado con Capsul y K-4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.

En el Cuadro 4, se presentan las características físicas y químicas de los sistemas de micropartículas (P-C, P-K, UF-C y UF-K), obtenidos bajo condiciones óptimas.

El contenido de betalaínas en las micropartículas entre los cuatro sistemas estudiados, no presentó diferencias significativas. Además, se observa que en todos los sistemas de micropartículas el contenido de betacianinas es mayor al contenido de betaxantinas, como se ha reportado previamente para tuna púrpura (Sáenz *et al.*, 2009).

La eficiencia de encapsulación (EE) es una medida que indica el grado de interacción entre el compuesto activo y el agente encapsulante. En general la EE tanto para betacianinas como betaxantinas alcanzó valores sobre 98% para todos los sistemas de micropartículas estudiados. Estos resultados se atribuyen a la fuerte interacción betalaínas-polímero debido a interacciones electrostáticas y/o formación de puentes de hidrógeno. Valores de EE de betalaínas similares a los encontrados en este estudio se reportaron previamente para micropartículas de *Opuntia ficus-indica* con maltodextrina e inulina (Sáenz *et al.*, 2009) y aislado proteico de soja (Torres, 2008). EE entre 90-93% se reportaron para micropartículas de indicaxantina con maltodextrina (Gandía-Herrero *et al.*, 2010).

Factores como las propiedades del agente encapsulante, características del agente activo, y las condiciones del proceso de secado deben ser consideradas al momento de diseñar un estudio con la finalidad de lograr altos porcentajes de EE (Jafari *et al.*, 2008). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas de micropartículas estudiados, para las EE de betacianinas y betaxantinas, mostrando que no hay un efecto del tipo de extracto y tipo de agente encapsulante sobre la eficiencia de encapsulación de betalaínas.

La recuperación de betacianinas y betaxantinas después del secado por atomización alcanzó valores en el rango de 64,8-77,8 y 66,7-100%, respectivamente. Recuperación de betanina de 88,2 % y 90% se reportaron para micropartículas de betarraga con goma arábica (Pitalua *et al.*, 2010) y con maltodextrina (Azeredo *et al.*, 2007), respectivamente. La recuperación de betacianinas fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para las micropartículas del sistema UF-K respecto a los sistemas P-C, P-K y UF-C. Este resultado se atribuye a que el sistema UF-K tiene mayor contenido de sólidos (32,4 g para UF-K versus 14,2 g para P-C, P-K y UF-C, contenidos determinados previamente)¹, lo cual afecta la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de la gota durante el proceso de secado permitiendo la difusión del agua pero reteniendo el agente activo (Gharsalloui *et al.*, 2007; Kenyon, 1995). Similarmente, Ravichandran *et al.* (2012) encontraron que la mezcla de maltodextrina con goma arábica, pectina o goma xantana aumentó la retención de betalaínas en micropartículas de betarraga. Contrariamente, Azeredo (2007) encontró que la retención de betanina fue independiente de la relación maltodextrina/betalaínas en micropartículas de betarraga. Por lo tanto, las características del agente encapsulante (como viscosidad y solubilidad) y su naturaleza pueden afectar la recuperación del agente activo en micropartículas obtenidas por secado por atomización

El rendimiento estuvo en un rango entre 62,6 y 69,4%, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los 4 sistemas de micropartículas estudiados. El contenido de humedad de los sistemas de micropartículas estudiados se encontró en el rango de 2,9% - 5,1%; valores habituales para micropartículas obtenidas por secado por atomización. Contenidos de humedad similares se reportaron para micropartículas de pulpa de tuna púrpura con maltodextrina e inulina (2,21 y 4,11%) (Sáenz *et al.*, 2009) y para pigmentos de amaranto encapsulados con maltodextrina (1,95 y 6,80%) (Cai y Corke, 2000).

¹ Tesis Doctorado Nutrición y Alimentos. Cristina Vergara. Universidad de Chile.

Las micropartículas de los 4 sistemas estudiados presentaron un tamaño de partícula entre 4,4 y 4,7 μm , con una distribución unimodal. Estos resultados están dentro del rango establecido para micropartículas obtenidas mediante secado por atomización (Gharsalloui *et al.*, 2007). Estudios previos muestran que pigmentos de amaranto encapsulados con maltodextrina (Cai y Corke, 2000), y pigmentos de tuna roja (*Opuntia lasiachanta*) encapsulados con maltodextrina (Díaz *et al.*, 2006) encontraron tamaños de partículas entre 5-50 μm y 5-40 μm , respectivamente.

Cuadro 4. Características físicas y químicas de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, de los sistemas de pulpa (P-C y UF-C) y extracto UF (UF-C y UF-K).

Sistema/Parámetro	P-C	P-K	UF-C	UF-K
	(X ± DS)	(X ± DS)	(X ± DS)	(X ± DS)
Razón (P ó UF)/AE	3:1	3:1	2,5:1	1:1
Temperatura de entrada (°C)	133	110	133	110
Betacianinas (mg EB ⁽¹⁾ / g)	0,346 ± 0,012 a	0,353 ± 0,007 a	0,361 ± 0,015 a	0,343 ± 0,018 a
Betaxantinas (mg EI ⁽²⁾ / g)	0,145 ± 0,004 a	0,155 ± 0,002 a	0,160 ± 0,001 a	0,150 ± 0,005 a
EE Betacianinas (%)	99,5 ± 0,02 a	99,3 ± 0,29 a	99,1 ± 0,40 a	99,6 ± 0,40 a
EE Betaxantinas (%)	98,6 ± 0,54 a	98,3 ± 0,60 a	98,7 ± 0,60 a	99,3 ± 0,60 a
PR Betacianinas (%)	64,8 ± 3,32 b	66,0 ± 2,28 b	72,4 ± 2,43 b	77,8 ± 2,40 a
PR Betaxantinas (%)	66,8 ± 2,87 b	66,7 ± 1,41 b	96,8 ± 2,90 a	100 ± 0,00 a
Rendimiento (%)	65,3 ± 5,1 a	69,4 ± 0,2 a	62,6 ± 6,80 a	65,7 ± 1,80 a
Humedad (%)	3,7 ± 0,40 b	3,2 ± 0,16 b	5,1 ± 0,04 a	2,9 ± 0,19 c
a _w	0,33 ± 0,00 b	0,36 ± 0,00 a	0,30 ± 0,01 c	0,30 ± 0,00 c
Tamaño de partícula D(3,2) (µm)	4,7	4,5	4,6	4,4

P-C: sistema pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema pulpa de tuna con K-4484; UF-C: sistema extracto ultrafiltrado de tuna con Capsul; UF-K: sistema extracto ultrafiltrado con K-4484; ⁽¹⁾EB: expresado como equivalente de betanina; ⁽²⁾EI: expresado como equivalente de indicaxantina; EE: eficiencia de encapsulación; PR: porcentaje de recuperación; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3). Letras distintas indican diferencias significativas entre los sistemas para cada parámetro (p < 0,05).

2.1. Morfología de las micropartículas

En la Figura 5 (A, B, C y D) se muestra las microfotografías SEM de los sistemas de micropartículas de P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidas bajo condiciones óptimas, respectivamente.

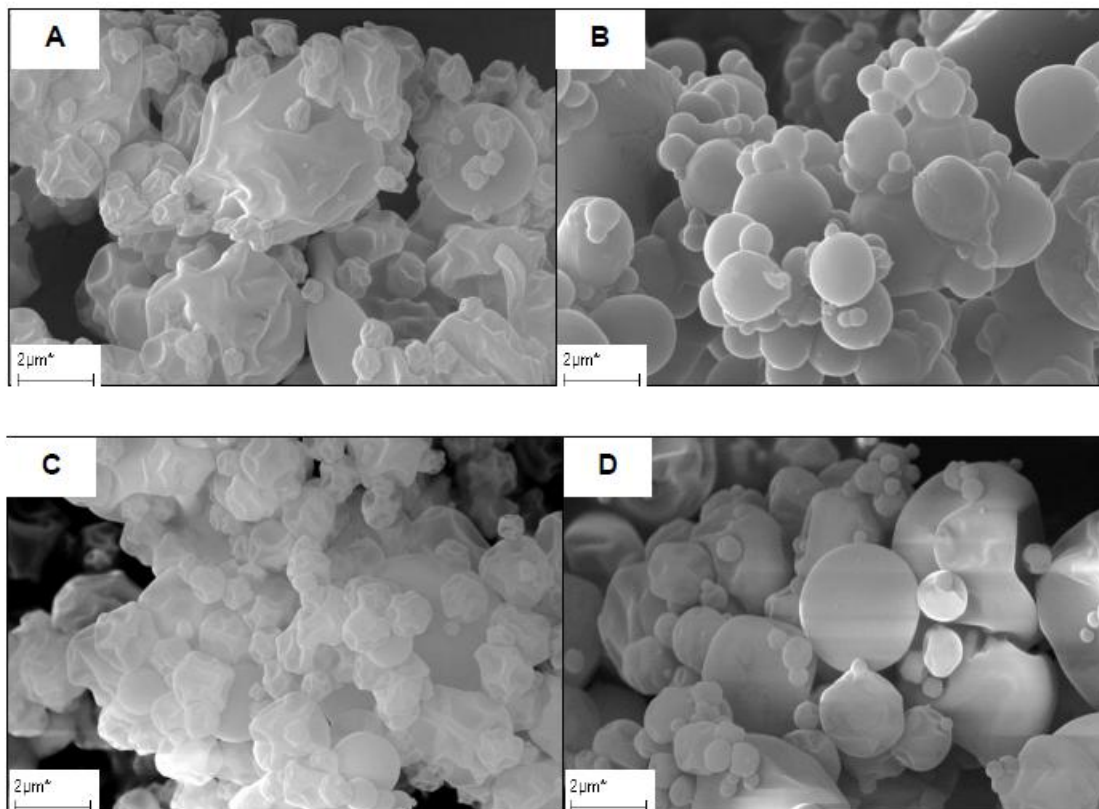


Figura 5. Microfotografías de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas: P-C (A), P-K (B), UF-C (C) y UF-K (D).

Las micropartículas obtenidas al utilizar Capsul® como agente encapsulante, P-C y UF-C (5A y 5C, respectivamente) se observan esféricas con notables indentaciones y rugosidad en su superficie y con tendencia a formar aglomerados. Mientras que, las micropartículas de los sistemas P-K y UF-K (5B y 5D, respectivamente) se observan esféricas, de superficie lisa, con menores indentaciones y menor tendencia a formar aglomerados. El encogimiento de las micropartículas

durante el proceso de secado se puede producir a bajas o altas temperaturas de entrada al secador (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). A bajas temperaturas, existe una menor difusión del agua y las partículas tienen más tiempo para encogerse, mientras que a altas temperaturas, la rápida evaporación del agua y la alta presión en el interior de las partículas, también produce encogimiento.

La naturaleza del encapsulante y parámetros que intervienen en el secado como: temperatura de alimentación al secador, temperatura del aire de entrada al secador, temperatura de salida del secador y la naturaleza de la solución, dispersión ó emulsión a secar, pueden influir en la morfología de las micropartículas (Kosaraju *et al.*, 2006).

ETAPA 3. Estabilidad de betalaínas en mezcla seca adicionada con micropartículas de pulpa (P) y extracto UF para bebida refrescante.

3.1. Caracterización de las mezclas secas

En la Figura 6 se muestra el coeficiente de variación (CV) de betacianinas frente al tiempo de mezclado para la formulación de mezcla seca con micropartículas del sistema P-C. Se eligió como tiempo de mezcla 12 minutos (Ver Anexo 6).

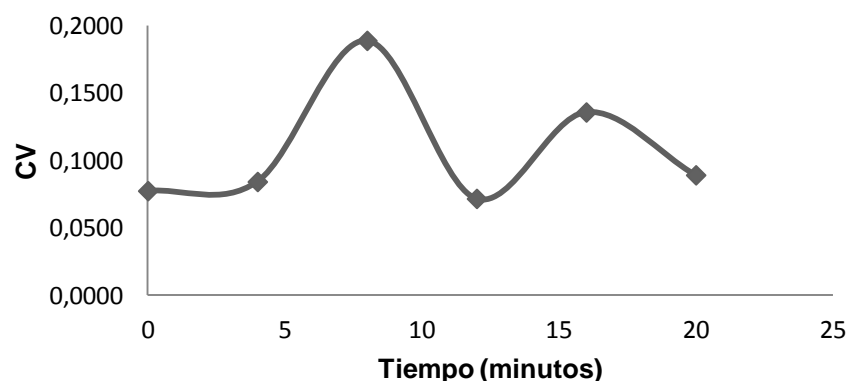


Figura 6. Coeficientes de variación de betacianinas durante el tiempo de mezclado para la formulación de mezcla seca con micropartículas del sistema P-C.

En el Cuadro 5 se presentan las características físicas y químicas de las mezclas secas formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K y reconstituídas.

Cuadro 5. Características físicas y químicas de las bebidas refrescantes formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K.

Sistema/Parámetro	Mezcla seca/	Mezcla seca/	Mezcla seca/	Mezcla seca/
	P-C	P-K	UF-C	UF-K
	(X ± DS)	(X ± DS)	(X ± DS)	(X ± DS)
Solubilidad	99 ± 0,05	99 ± 0,19	99 ± 0,06	99 ± 0,05
pH	2,79 ± 0,01	2,89 ± 0,01	2,80 ± 0,01	2,82 ± 0,00
Betacianinas (mg EB ⁽¹⁾ / L)	3,835 ± 0,06	4,094 ± 0,04	4,156 ± 0,05	3,705 ± 0,04
Betaxantinas (mg EI ⁽²⁾ /L)	1,364 ± 0,03	1,460 ± 0,02	1,476 ± 0,02	1,321 ± 0,01

P-C: sistema pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema pulpa de tuna con K-4484; UF-C: sistema extracto ultrafiltrado de tuna con Capsul; UF-K: sistema extracto ultrafiltrado con K-4484; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3).

En el Cuadro 5 se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa para la solubilidad entre las cuatro mezclas secas. Las mezclas secas presentaron alta solubilidad, en línea con la solubilidad de los agentes encapsulantes (Capsul® y K-4484) y el carácter hidrofílico de las betalaínas. Similarmente, Cano-Chauca *et al.* (2005), reportó valores cercanos a 92% de solubilidad en micropartículas de pulpa de mango, obtenidas por secado por atomización usando maltodextrina, goma arábica y almidón ceroso.

Para las mezclas secas reconstituídas, el pH estuvo comprendido entre 2,79 y 2,89 y entre 3,705 a 4,156 mg EB/L para betacianinas y entre 1,321 a 1,476 mg EI/L para betaxantinas. En todos los sistemas se observa que las betacianinas se encuentran en mayor proporción que las betaxantinas. Esto es una tendencia para la tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) como reportó previamente Sáenz *et al.* (2009).

3.2. Estabilidad de betalainas en las mezclas secas formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K durante el almacenamiento.

En la Figura 7 y 8, se presenta el gráfico del porcentaje de retención de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, frente al tiempo de almacenamiento a 30°C, de las mezclas secas elaboradas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K.

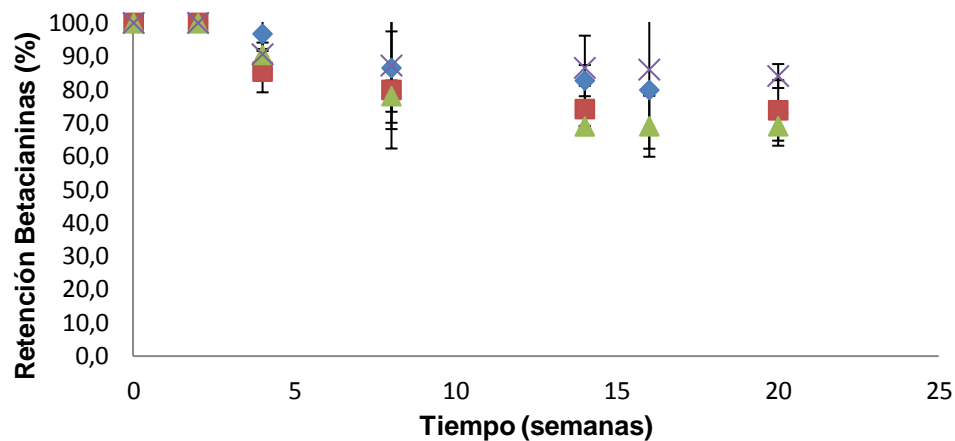


Figura 7. Porcentajes de retención de Betacianinas en el tiempo a 30°C, en mezclas secas para bebida refrescante formuladas con micropartículas de los sistemas P-C (◇), P-K (□), UF-C (Δ) y UF-K (X).

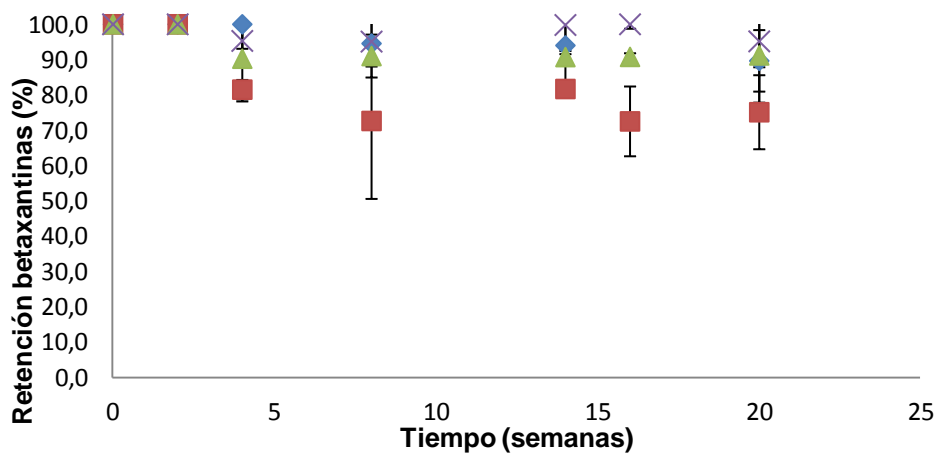


Figura 8. Porcentajes de retención de Betaxantinas en el tiempo a 30°C, en mezclas secas para bebida refrescante formuladas con micropartículas de los sistemas P-C (◇), P-K (□), UF-C (Δ) y UF-K (X).

En todos los sistemas el porcentaje de retención de betalaínas disminuyó significativamente en el tiempo.

Cuando se utiliza K como agente encapsulante, el sistema elaborado con extracto UF tuvo una retención de betacianinas y betaxantinas significativamente mayor con respecto al sistema con P (Anexos 7 y 8). Sin embargo, este comportamiento no se observó cuando se utilizó C como agente encapsulante. El Capsul es un almidón ceroso de maíz modificado químicamente que incorpora a su estructura un componente lipofílico (Finotelli y Rocha-Leao, 2005); mientras que K es un polímero con propiedades hidrofílicas.

Cuando se utilizó UF como extracto, K mostró una retención de betacianinas significativamente mayor respecto a C (Anexo 7). Sin embargo, cuando se utilizó P como extracto, C mostró una retención de betaxantinas significativamente mayor, respecto a K (Anexo 8).

VI. CONCLUSIONES

- Mediante secado por atomización de pulpa y extracto ultrafiltrado de tuna púrpura, se logró un alto porcentaje de encapsulación (>98%) y recuperación de betacianinas y betaxantinas, para los dos agentes encapsulantes (Capsul® y K-4484) estudiados.
- Las mezclas secas adicionadas de micropartículas de P-C, UF-C, P-K y UF-K, almacenadas a 30°C, mostraron una alta estabilidad, en línea con un alto porcentaje de retención de betalaínas (betacianinas 69-94% y betaxantinas 75-95%), después de 20 semanas de almacenamiento.
- La mezcla seca con UF-K, presentó mayor porcentaje de retención de betalaínas (betacianinas e indicaxantina) respecto a la mezcla seca con P-K, a las 20 semanas de almacenamiento, mostrando el efecto del tipo de extracto.
- Se corroboró la hipótesis planteada para la mezcla seca con UF-K, la cual presentó una menor degradación de betalaínas respecto a la mezcla seca con P-K.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALAMILLA-BELTRÁN L., CHANONA-PEREZ J., JIMENEZ-APARICIO A. AND GUTIERRES-LOPEZ G. 2005. Description of morfological changes of particles along spray drying. *Journal of food Engineering* 67: 179-184.

ALARD D., WRAY V., GROTHJAHN L., REZNIK H. AND STRACK D. 1985. Neobetanin: isolation and identification from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry* 24: 2383–5.

ALLEGRA M., FURTMULLER P., JANTSCHKO W., ZEDERBAUER M., TESORIERE L., LIVREA M. AND OBINGER C. 2005. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332: 837–844.

AOAC. 1996. Official methods of analysis of the association official analytical chemists. 14° Edition. Washington D.C. U.S.A. 1141p.

AZEREDO H.M.C., SANTOS A.N., SOUZA A.C.R., MENDES K.C.B. Y ANDRADE M.I.R. 2007. Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract. *Amer. Journal Food Technology* 2 (4): 307–312.

AZEREDO H. 2008. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 2365-2376.

BUTERA D., TESORIERE L., DI GAUDIO F., BONGIORNO A., ALLEGRA M., AND PINTAUDI A.M. 2002. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal Agriculture Food Chemistry* 50: 6895–6901.

CAI Y. AND CORKE H. 2000. Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. *Journal Food Science* 65: 1248-1252.

CAI Y.Z., SUN M. AND CORKE H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *Journal Agriculture Food Chemistry* 51: 2288-2294.

CAI Y.Z., SUN M. AND CORKE H. 2005. Characterization and application of betalain pigments from plants of the amaranthaceae. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 370–376.

CANO-CHAUCA M., STRINGHETA P.C., RAMOS A.M. AND CAL-VIDAL J. 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6: 420-428.

CASSANO A., CONIDI C., TIMPONE R., D'AVELLA M. AND DRIOLI E. 2007. A membrane-based process for the clarification and concentration of cactus pear juice. *Journal of Food Engineering* 80: 914–921.

CASSANO A., CONIDI C. AND DRIOLI E. 2010. Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination* 250: 1101-1104.

CASTELLAR R., OBON J., ALACID M. AND FERNÁNDEZ-LÓPEZ J. 2003. Colour properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2772–2776.

CHAMPAGNE C. AND FUSTIER P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 184-190.

CHEN L., REMONDETTO G.E. AND SUBIRADE M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Science and Technology* 17: 272-283.

CHILE 2011. Reglamento Sanitario de los alimentos. Ministerio de Salud. Decreto. No 977. D.O. 13.V.97.

DELGADO-VARGAS F., JIMÉNEZ A. AND PAREDES-LÓPEZ O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 173-289.

DESAI K. G.H. AND PARK H.J. 2005. Recent development in microencapsulation of foods ingredients. *Drying Technology* 23: 1361–1394.

DESOBRY S., NETT F. AND LABUZA T. 1997. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *Journal Food Science* 62: 1158-1162.

DE VOS P., FAAS M., SPASOJEVIC M. AND SIKKEMA J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20: 292–302.

DÍAZ F., SANTOS E.M., FILARDO S., VILLAGÓMEZ R. AND SCHEINVAR L. 2006. Colorant extraction from a red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application. Electronic Journal Environmental Agricultural Food Chemistry 5: 1330-1337.

DZIEZAK J. 1998. Microencapsulation and encapsulated food ingredients. Food Technology 42: 136-151.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ J. AND ALMELA L. 2001. Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. Journal of Chromatography A. 913: 415-420.

FINOTELLI P. AND ROCHA-LEAO M. 2005. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray drying. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. 11p.

GALATI E., MONDELLO M., GIUFFRIDA D., DUGO G., MICELI N., PERGOLIZZI S. AND TAVIANO M. 2003. Chemical characterization and biological effects of sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit Juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 4903-4908.

GANDÍA-HERRERO F., JIMÉNEZ-ATIENZAR M., CABANES J., GARCÍA-CARMONA F. AND ESCRIBANO J. 2010. Stabilization of the Bioactive Pigment of *Opuntia* Fruits through Maltodextrin Encapsulation. Agriculture Food Chemistry 58: 10646-10652.

GENTILE C., TESORIERE, L., ALLEGRA M., LIVREA M. AND D'ALESSIO P. 2004. Antioxidant betalainas from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. Annals New York Academy Sciences 1028: 481-486.

GHARSALLAOUI A., ROUDAUT G., CHANBIN O., VOILLEY A. Y SAUREL R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Research International 40: 1107-1121.

GIBBS B.F., KERMASHA S., ALLI I. AND MULLIGAN C.N. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. International Journal of Food Sciences and Nutrition 50: 213-224.

GOUD K., DESAI H. AND PARK J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food Ingredients. Drying Technology 23: 1361-1394.

- GUIZARD C. 1999. Técnicas membranarias de filtración de líquidos: micro, ultra, nanofiltración y osmosis inversa. Cuaderno FIRP S451B. Escuela Ingeniería Química, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. 56p.
- HEIM K., TAGLIAFERRO A. AND BOBILYA D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional Biochemistry* 13: 572-584.
- HERBACH K.M., STINTZING F.C. AND CARLE R. 2004. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of redbeet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science C: Food Chemistry and Toxicology* 69: C491-498.
- HERBACH K.M., STINTZING F.C. AND CARLE R. 2005. Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phyllocactin and hydrocochenone by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19:2603–16.
- HERBACH K.M., STINTZING F.C. Y CARLE R. 2006. Betalain stability and degradation – structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science* 71: R41-R50.
- HOGAN S.A., MCNAMEE B.F., O'RIORDAN E.D. AND O'SULLIVAN M. 2001. Microencapsulating properties of sodium caseinate. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49: 1934-1938.
- HUANG A. S. Y VON ELBE J. H. 1985. Kinetics of the degradation and regeneration of betanin. *Journal of Food Science* 50: 1115-1129.
- HUANG A. S. AND VON ELBE J. H. 1987. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanin. *Journal of Food Science* 52: 1689-1693.
- JAFARI S., ASSADPOOR E., HE Y. AND BHANDARI B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. *Drying Technology* 26: 816-835.
- JESUS D., LEITE M., SILVA L., MODESTA R., MATTA V. AND CABRAL L. 2006. Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering* 81: 287-291.
- KANNER J., HAREL S. AND GRANIT R. 2001. Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49: 5178-5185.

KENYON M. 1995. Modified starch, maltodextrin and corn syrup solids as wall material for food encapsulation. In: S. Risch and G. Reineccius.(eds) Encapsulation and controlled release of food ingredients pp 42-50. Washington DC, American Chemical Society.

KIM Y.D. AND MORR C.V. 1996. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. Journal Agricultural Food Chemistry 44: 1314-1320.

KOSARAJU S., D'ATH L. AND LAWRENCE A. 2006. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. Carbohydrate Polymers 64: 163-167.

LIVREA M. AND TESORIERE L. 2006. Health benefits and bioactive components of the fruits from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. Journal of the Professional Association for Cactus Development 73-90.

LOKSUWAN J. 2007. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. Food Hydrocolloids 21: 928-935.

LÓPEZ D. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. Revista Cubana de Farmacia 44: 381-389.

MATSUHIRO B., LILLO, L., SAÉNZ C., URZÚA C. AND ZÁRATE O. 2006. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. Carbohydrate Polymers 63: 263-267.

MINEMOTO Y., HAKAMATA K., ADACHI S. AND MATSUNO R. 2002. Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by spray-drying. Journal of Microencapsulation 19: 181-189.

MORENO D., GARCÍA C. AND GIL J. 2008. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. Phytochemistry Reviews 7: 261-280.

NATIONAL STARCH & CHEMICAL. 2001^A. Ficha técnica del producto: Capsul. [Disponible en <http://www.foodinnovation.com/foodinnovation/en-us/Pages/Home.aspx>]

NATIONAL STARCH & CHEMICAL. 2001^B. Ficha técnica del producto: K-4484. [Disponible en <http://www.foodinnovation.com/foodinnovation/en-us/Pages/Home.aspx>]

OBÓN J.M., CASTELLAR M.R., ALACID M. AND FERNANDEZ- LOPEZ J.A. 2009. Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering* 90: 471-479.

ODOUX E. AND DOMÍNGUEZ-LÓPEZ A. 1996. Le figuier de barbarie: Une source industrielle de betalaines? *Fruits* 51: 61-78.

OSBORNE D. AND VOOGT P. 1986. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Zaragoza, España: Ed. Acribia.

PARRA V. 2004. Estudio comparativos en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile.

PIATTELLI M., AND L MINALE. 1964. Pigments of Centrospermae-II. Distribution of betacyanins. *Phytochemistry* 3: 547-557.

PITALUA E., JIMENEZ M., VERNON-CARTER E. J. AND BERISTAIN C.I. 2010. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing* 88: 253-258.

RAMÍREZ W. 2006. Consideraciones básicas y viabilidad de procesos de membranas de ósmosis inversa y nanofiltración como alternativa para el tratamiento de agua en Colombia. Monografía final de carrera. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Química. Manizales, Colombia. 90p.

RAVICHANDRAN K., PALANIRAJ R., THAW SAW N., GABR A., AHMED A., KNORR D. AND SMETANSKA I. 2012. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extracts. *Food Science and Technology* DOI 10.1007/s13197-012-0728-6

REIS R. AND ZYDNEY A. 2007. Bioprocess membrane technology. *Journal of Membrane Science* 297: 16-50.

ROBERT P., CARLSSON R., ROMERO N. AND MASSON L. 2003. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (*rosa rubiginosa*) oleoresin. *Journal of the American Oil Chemists Society* 80: 1115–1120.

RODRÍGUEZ-HERNANDEZ G.R., GONZÁLES R., GRAJALES A. AND RUIZ M.A. 2005. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptachanta*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology* 23: 955-973.

SÁENZ C. 2004. Compuestos funcionales y alimentos derivados de *Opuntia* spp. p. 211-222. In: Esparza, G., Valdez, R. y Méndez, S. eds. *El Nopal, Tópicos de actualidad*. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

SÁENZ C. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 165 p. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO* N°162.

SÁENZ C., TAPIA S., CHAVEZ J. AND ROBERT P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* 114: 616–622.

SÁNCHEZ N. 2006. Extracción y caracterización de los principales pigmentos del *Opuntia joconoste c.v.* (xoconostle). Tesis para obtener el grado de maestro en tecnología avanzada. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada, Instituto Politécnico Nacional. Mexico D.F.

SANTINHO A.J.P., URETA J.M., FREITAS O. AND PEREIRA N.L. 2002. Physicochemical characterization and enzymatic degradation of casein microcapsules prepared by aqueous coacervation. *Journal of Microencapsulation* 19: 549-559.

SCHWARTZ S. AND VON ELBE J. 1983. Identification of betanin degradation products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 176: 448-53.

SEPÚLVEDA E., SÁENZ C. AND GÓMEZ C. 2003. Determinación de betanina en ecotipos de tuna roja colectados en Chile. Memoria IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional Conocimiento y aprovechamiento del nopal. Zacatecas, México. pp. 282-285.

SINGLETON V. AND ROSSI J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

SKOOG D., HOLLER F.J. AND NIEMAN T. 2003. "Principios de análisis instrumental" Quinta Edición. Universidad Complutense de Madrid, España.

SOUZA T.C.R., PARIZE A.L., BRIGHENTE I.M.C., FÁVERE V.T. AND LARANJEIRA M.C.M. 2005. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. *Journal of Microencapsulation* 22: 511-520.

STINTZING F.C. SCHIEBER A. AND CARLE R. 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research Technology* 212: 396-407.

STINTZING F. AND CARLE R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 15: 19–38.

STINTZING F., HERBACH K., MOSSHAMMER M., CARLE R., YI W., SELLAPPAN S., AKOH C. AND FELKER P. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53: 442-451.

TAPIA S. 2007. Microencapsulación de compuestos bioactivos de tuna (*Opuntia Ficus-Indica*). Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias, mención Producción Agroindustrial. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago, Chile. 69 p.

TESORIERE L., FAZZARI M., ALLEGRA M. AND LIVREA M. A. 2005. Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7851-7855.

TORRES V. 2008. Microencapsulación de “polifenoles y betalainas” desde un extracto acuoso de tuna (*Opuntia ficusindica*), mediante secado por atomización. Universidad Tecnológica Metropolitana.

TSUDA S., MURAKARNI M., KANO K., TANIGUCHI K. AND SASAKI Y.F. 2001. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences* 61: 92-9.

VON ELBE J.H., MAING I.Y. AND AMUNDSON C.H. 1974. Color stability of betanin. *Journal Food Sciences* 39: 334-337.

WAGNER L. AND WARTHESEN J. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal Food Sciences* 60: 1048-1053.

WILCOX M.E., WYLER H. AND DREIDING A.S. 1965. Stereochemistry of betanidin and isobetanidin. VIII. Structure of the bark pigment betanin. *Helvetica Chimica Acta* 48: 1134-47.

WU L., HSU H., CHEN Y., CHIU C., LIN Y. AND HO J. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry* 95: 319-327.

YÁNEZ J., SALAZAR J. A., CHAIRES L., JIMÉNEZ J., MÁRQUEZ M. AND RAMOS E.G. 2005. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* 21: 313-319.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Determinación del contenido de azúcares totales por el método de Antrona (Osborne y Voogt, 1986).

Fundamento: Consiste en determinar colorimétricamente el contenido de azúcares solubles presentes en la muestra, la cual ha sido previamente hidrolizada con ácido perclórico.

Materiales: Acido perclórico al 70%, reactivo de Antrona, solución de glucosa (0,1%), agua destilada.

Procedimiento: Se tomaron 2 g de muestra, en un matraz erlenmeyer con tapa y se mezclaron con 14 mL de agua destilada y 11 mL de ácido perclórico al 52%, una vez agitada la mezcla se dejó reposar por 12 horas para producir la hidrólisis de la muestra. Después de la hidrólisis, la mezcla se filtró en papel filtro y se recibió en un matraz aforado de 250 mL, el filtro se lavó con agua destilada y luego se aforó. De esta solución, se tomaron 10 mL y se agregaron a un matraz de 100 mL aforando con agua destilada. De esta última solución se tomó una alícuota de 1 mL y se agregó a un tubo con tapa, en el cual se agregaron 5 mL del reactivo de Antrona. El tubo se agitó en un Vortex y se colocó en un baño a temperatura de ebullición por 12 minutos. Luego, se enfrió rápidamente con agua fría y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. Paralelamente se prepararon 2 tubos, uno con 1 mL de agua destilada más los 5 mL de reactivo de Antrona (blanco) y otro con 1 mL de glucosa (0,1%) más los 5 mL de reactivo de Antrona (patrón).

Para los cálculos del contenido de azúcares totales, se realizó una curva de calibración de glucosa, Figura 9. ($Y=4,564X + 0,046$; $R^2=0,99$; donde, X es la concentración de glucosa e Y es la absorbancia de la muestra (U.A.)).

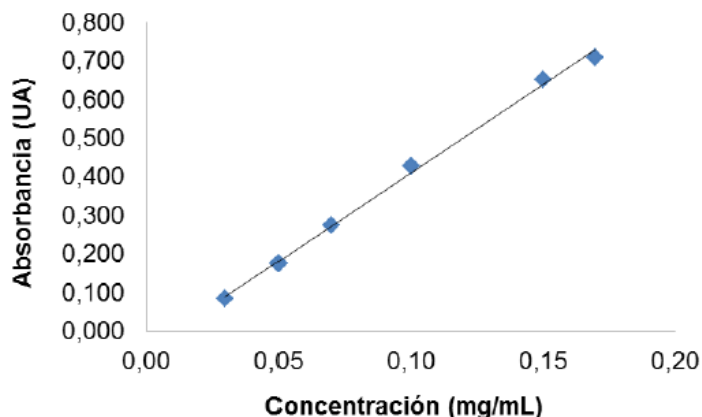


Figura 9. Curva de calibración de glucosa.

Anexo 2. Determinación del contenido de polifenoles a través del método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

Fundamento: Consiste en oxidar los compuestos fenólicos presentes en la muestra, por medio de una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico conocida como reactivo de Folin-Ciocalteu, los cuales en presencia de fenoles, son reducidos a óxidos azules de tungsteno y molibdeno.

Materiales

- Agua destilada
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio al 20%. Se pesó 200 g de carbonato de sodio anhidro y se disolvió en 800 mL de agua destilada hervida. Después de 24 horas se filtró y se aforó a 1000 mL con agua destilada hervida.

Preparación de la muestra de pulpa: Se pesó 8 g de pulpa y se aforó con agua destilada en un matraz de 25 mL, luego se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm, y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45 μm .

Método Folin-Ciocalteu: En un matraz aforado de 10 mL se colocó 0,1 mL de pulpa preparada y se agregó 4,9 mL de agua destilada. Luego, se agregó 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se dejó en reposo durante 3 minutos. Posteriormente se añadió 1,7 mL de carbonato de sodio al 20%, se aforó con agua destilada y se dejó reposar por 30 minutos a 20°C. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm.

Se usó un blanco que estuvo compuesto por 5 mL de agua destilada, 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 1,7 mL de carbonato de sodio y se aforó a 10 mL con agua destilada. Para los cálculos del contenido de polifenoles totales, se realizó una curva de calibración con ácido gálico, Figura 10. ($Y=0,001X + 0,065$; $R^2=0,99$; donde, X es la concentración de polifenoles e Y es la absorbancia de la muestra (U.A.)).

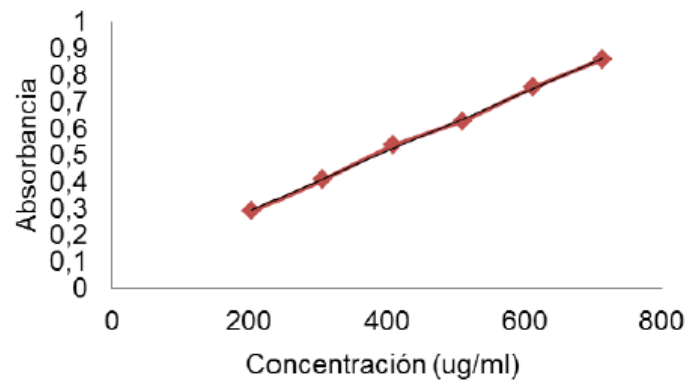


Figura 10. Curva de calibración de ácido gálico

Anexo 3. Determinación del contenido de betalaínas por espectrofotometría en pulpa y extracto ultrafiltrado

Materiales

- **Buffer Mcllvaine´s pH 6,5:** se preparó una solución A de ácido cítrico 0,1 M y una solución B de fosfato monosódico 0,2 M. Para 100 mL de solución se mezclaron 29,65 mL de A y 70,35 mL de B.
- **Preparación de la muestra de pulpa:** se pesó 4 g y se aforó con agua destilada en un matraz de 25 mL, posteriormente se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm en una centrifuga modelo 5804 R Eppendorf AG, el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0,45 µm, se tomó una alícuota de 1 mL que se aforó en un matraz de 10 mL con la solución buffer Mcllvaine´s.
- **Extracto ultrafiltrado:** se tomó una alícuota de 0,25 mL y se aforó con la solución de Mcllvaine´s en un matraz de 10 mL.

Para todas estas mediciones de betacianinas y betaxantinas en el espectrofotómetro se usó una longitud de onda de 538 nm y 480 nm, respectivamente. El contenido de betacianina y betaxantina en pulpa, extracto ultrafiltrado, micropartículas y mezcla seca, expresado como betanina e indicaxantina, respectivamente, se calculó de acuerdo a la ecuación 2:

$$\text{(Ec. 2)} \quad B \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A \cdot FD \cdot PM \cdot V \cdot 1000}{\epsilon \cdot W \cdot L}$$

Donde, A es la absorbancia corregida a 600 nm, FD el factor de dilución, V el volumen de la muestra, W el peso de la muestra, L la longitud de la trayectoria (1 cm) para la cubeta, PM el peso molecular, para betanina e indicaxantina (550 g/mol y 308 g/mol, respectivamente), ϵ el coeficiente de extinción molar para betanina e indicaxantina (60000 L/(mol cm) y 48000 L/(mol cm), respectivamente).

Anexo 4. Método para determinar betalaínas totales y superficiales en micropartículas

a) Betalaínas totales

Se pesó 0,2 g de micropartículas, se disolvieron con 2 mL de una solución compuesta por etanol:ácido acético:agua destilada (50:8:42), y se homogenizaron 1 min, utilizando un agitador Vortex mixer (Cenco Instrument, breda, Netherlands). Para asegurar la ruptura de la micropartícula se sonicó durante 50 minutos (intervalos de 20 minutos y 10 de reposo), con un sonicador Ultrasonic FS30H. Luego se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm en una centrifuga Hettich Rotofix 32. Finalmente, se tomó 1 mL del sobrenadante y se aforó con reactivo buffer McIlvaine's en un matraz de aforo de 10 mL, se determinó la absorbancia y se calculó el contenido de betalainas utilizando la ecuación 3.

b) Betalaínas superficiales

Para la determinación de betalaínas superficiales, se realizó una extracción directa con 0,1 g de micropartículas en 2 mL de una mezcla etanol-metanol (1:1), en un agitador Vortex mixer (Cenco Instrument, Breda, The Netherlands), durante 1 min. Luego, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm en una centrifuga Hettich Rotofix 32. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se aforó con reactivo buffer McIlvaine's en un matraz de aforo de 10 mL, se determinó la absorbancia y se calculó el contenido de betalainas utilizando la ecuación 3.

c) Betalaínas totales en la mezcla seca para jugo.

Para determinar betalaínas totales en la mezcla seca, se llevó a cabo el mismo procedimiento que para betalainas totales en micropartículas, pero pesando 0,1 g de polvo y el proceso de centrifugación se realizó durante 10 minutos a 3000 rpm. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se aforó con la solución McIlvaine's en un matraz de 10 mL. Luego se determinó la absorbancia y se calculó el contenido de betalainas utilizando la ecuación 3.

Anexo 5. Carta de representación del color

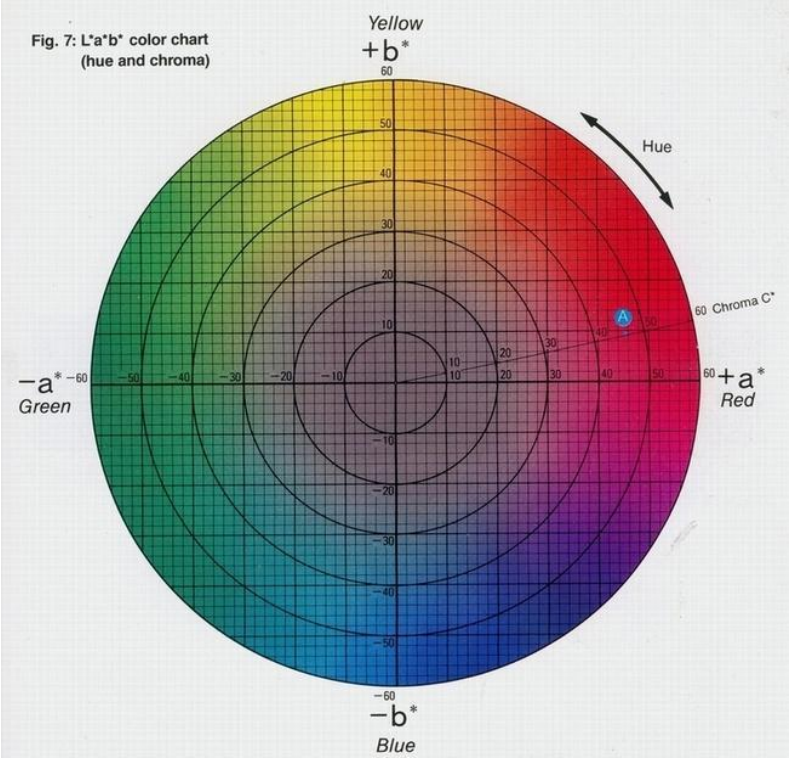


Figura 11. Carta de color (Fuente: Konica Minolta Sensing, INC. 2007).

Anexo 6. Contenidos de betacianinas durante el tiempo de mezclado para la formulación de mezcla seca con micropartículas del sistema P-C.

Tiempo (minutos)	Betacianinas (mg/g polvo)
0	0,011
	0,009
	0,011
	0,011
	0,011
X	0,011
CV	0,077
4	0,011
	0,013
	0,011
	0,013
	0,011
X	0,012
CV	0,084
8	0,013
	0,011
	0,011
	0,011
	0,007
X	0,011
CV	0,189
12	0,024
	0,022
	0,022
	0,020
	0,020
X	0,021
CV	0,072
16	0,024
	0,020
	0,016
	0,020
	0,018
X	0,020
CV	0,136
20	0,020
	0,018
	0,018
	0,022
	0,022
X	0,020
CV	0,089

X: promedio; CV: coeficiente de variación.

Anexo 7. Porcentajes de retención de betacianinas en mezclas secas adicionadas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K, para bebidas refrescantes almacenadas a 30°C.

Tiempo (semanas)	Mezcla seca/P-C (X ± DS)	Mezcla seca/P-K (X ± DS)	Mezcla seca/UF-C (X ± DS)	Mezcla seca/UF-K (X ± DS)
0	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
4	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
8	96,71 ± 4,51	85,37 ± 6,21	90,39 ± 3,71	90,59 ± 5,40
12	86,45 ± 18,33	79,87 ± 17,59	78,01 ± 4,69	87,21 ± 17,20
14	82,67 ± 4,68	74,12 ± 6,99	68,92 ± 0,15	86,49 ± 9,69
16	79,84 ± 0,23	62,6 ± 0,08	68,96 ± 9,16	85,98 ± 23,76
20	73,0 ± 9,84 b	73,8 ± 0,83 b	69,0 ± 4,33 b	84,1 ± 3,60 a

P-C: micropartículas pulpa de tuna con Capsul; P-K: micropartículas pulpa de tuna con K-4484; UF-C: micropartículas de extracto ultrafiltrado con Capsul; UF-K: micropartículas de extracto ultrafiltrado con K-4484; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3). Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (p < 0,05).

Anexo 8. Porcentajes de retención de betaxantinas en mezclas secas adicionadas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K, para bebidas refrescantes, almacenadas a 30°C.

Tiempo (semanas)	Mezcla seca/P-C (X ± DS)	Mezcla seca/P-K (X ± DS)	Mezcla seca/UF-C (X ± DS)	Mezcla seca/UF-K (X ± DS)
0	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
2	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
4	100 ± 6,94	81,48 ± 2,75	90,25 ± 12,12	95,29 ± 6,69
8	94,55 ± 6,52	72,60 ± 22,09	91,00 ± 6,08	95,10 ± 6,54
14	94,00 ± 14,59	81,66 ± 0,25	90,71 ± 0,84	99,80 ± 7,37
16	99,60 ± 0,00	72,48 ± 9,89	90,76 ± 1,03	100 ± 1,26
20	89,6 ± 8,72 a	75,1 ± 10,49 b	91,2 ± 13,38 a	95,17 ± 7,35 a

P-C: micropartículas pulpa de tuna con Capsul; P-K: micropartículas pulpa de tuna con K-4484; UF-C: micropartículas de extracto ultrafiltrado con Capsul; UF-K: micropartículas de extracto ultrafiltrado con K-4484; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3). Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (p < 0,05).