



UNIVERSIDAD DE CHILE

DOCTORADO EN NUTRICION Y ALIMENTOS

EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE BETALAÍNAS DE TUNA PÚRPURA (*Opuntia ficus-indica*) MEDIANTE TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS Y MICROENCAPSULACIÓN, COMO COLORANTE ALIMENTARIO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de

Doctor en Nutrición y Alimentos

Programa Conjunto

**Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de
Nutrición y Tecnología de Alimentos.**

Por

Cristina del Carmen Vergara Hinostroza

Director de Tesis Profesor Doctor:

Paz Robert Canales

Co-Director de Tesis Doctor:

Carmen Sáenz Hernández

Santiago, 2013



UNIVERSIDAD DE CHILE

DOCTORADO EN NUTRICION Y ALIMENTOS

EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE BETALAÍNAS DE TUNA PÚRPURA (*Opuntia ficus-indica*) MEDIANTE TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS Y MICROENCAPSULACIÓN, COMO COLORANTE ALIMENTARIO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de

Doctor en Nutrición y Alimentos

Programa Conjunto

**Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de
Nutrición y Tecnología de Alimentos.**

Por

Cristina del Carmen Vergara Hinostroza

Director de Tesis Profesor Doctor:

Paz Robert Canales

Co-Director de Tesis Doctor:

Carmen Sáenz Hernández

ESTA TESIS FORMA PARTE DEL PROYECTO FONDECYT N°1110126

Santiago, 2013

**EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE BETALAÍNAS DE TUNA
PÚRPURA (*Opuntia ficus-indica*) MEDIANTE TECNOLOGÍA DE
MEMBRANAS Y MICROENCAPSULACIÓN, COMO COLORANTE
ALIMENTARIO**

Por

CRISTINA DEL CARMEN VERGARA HINOSTROZA

**Tesis presentada y aprobada como parte de los requisitos para optar al Grado
Académico de Doctor en Nutrición y Alimentos**

COMITÉ DE TESIS

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Paz Robert Canales

Aprobado

Prof. Carmen Sáenz Hernández

Aprobado

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Lilian Abugoch

Aprobado

Prof. Beatriz Cancino

Aprobado

Prof. Jorge Chávez

Aprobado

Prof. Alvaro Peña

Aprobado

Prof. María Antonieta Valenzuela

Aprobado

DEDICATORIA

A Luis mi esposo, compañero y amigo.

A mis padres, porque todo lo que soy es gracias a ellos.

“Donde está tu tesoro, allí está tu corazón” (Mt. 6, 19-23)

RESUMEN BIOGRAFICO

Cristina Vergara Hinostriza, nace en Osorno el 27 de diciembre de 1982. Realiza sus estudios secundarios en el Colegio Preciosa Sangre de Purranque, egresando el año 2000. En el año 2001 inició sus estudios en la carrera de Ingeniería de Alimentos en la Universidad Austral de Chile, obteniendo en Diciembre de 2005 el Grado Académico de Licenciada en Ciencias de los Alimentos, y en Junio de 2007 el Título de Ingeniero en Alimentos. Ejerce su profesión en el ámbito de la investigación trabajando en diversos proyectos en la Universidad Austral de Chile. Ingresa el año 2009 al programa conjunto Doctorado en Nutrición y Alimentos de la Universidad de Chile. La Tesis de Doctorado la realizó en el Laboratorio de Química de los Alimentos y de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Bajo la dirección de la Dra. Paz Robert y Dra. Carmen Sáenz. En paralelo participa en actividades académicas, proyectos y como colaboradora de tesis de pre y postgrado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme cada día y por cada persona que ha puesto en mi camino.

A Luis por acompañarme en ésta aventura, por ser un gran compañero, por impulsarme a ser mejor cada día, por su incondicional cariño, amor y paciencia.

A mis padres, Myrta y Rudy, porque sus enseñanzas me han llevado a estar aquí y a lograr con felicidad cada meta en el camino.

A Myrtita, Julián y Mónica porque siempre tuvieron una palabra de ánimo y cariño, y por sus constantes inyecciones de alegría.

A la Dra. Paz Robert, mi directora y guía de tesis, por su acogida en el laboratorio y por incorporarme a su grupo de trabajo, gracias por el apoyo tanto académico como personal, por sus consejos, su gran dedicación, paciencia, por despertar en mí la curiosidad científica y calidad profesional.

A mi co-directora de tesis, Dra. Carmen Sáenz por recibirme con gran entusiasmo, por su constante apoyo, ayuda y dedicación, por impulsar cada idea e investigación en el camino.

A los profesores de la comisión informante de tesis: Lilian Abugoch, Jorge Chávez, Alvaro Peña, por sus consejos y apoyo en este trabajo. A la prof. Beatriz Cancino por acogerme en su laboratorio de membranas y brindar su apoyo durante este trabajo.

A mi amiga y colega Paula García, por ser una gran compañera por toda su ayuda en el desarrollo de mi tesis y en especial en la redacción de ella, por estar ahí a toda hora y con una sonrisa, por apoyarme siempre.

A mis amigos de los laboratorios: Manuel Palma, Leticia Andueza, Andrés Bustamante, Paula Jiménez, Graciela Cáceres, Juan Carlos Moreno, Anita Fabry, Inés Cea, Andrés Ramírez y Cristián Encina, porque con cada detalle me ayudaron cada día.

A mis compañeros y amigos de doctorado: Estefanía Medina, Denisse Jorquera, Sussanne Reyes, Rodrigo Chamorro y Rodrigo Valenzuela.

A mis alumnos: Héctor Gómez, Ivonne Castillo, Francisco Alfaro, Barcyette Henríquez y Francisco Carmona.

A Conicyt por la Beca de Doctorado en Chile N° 21090694 y la Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral N° 24110060.

Al proyecto Fondecyt N°1110126 por el financiamiento para llevar a cabo este trabajo.

INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCION	1
1.1 COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA TUNA PÚRPURA (<i>OPUNTIA FICUS-INDICA</i>) ...	2
1.2 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS BETALAÍNAS Y OTROS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA TUNA.....	5
1.3 ESTABILIDAD DE LAS BETALAÍNAS	7
<i>1.3.1 Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3.2 Vías de degradación de las betalaínas</i>	<i>9</i>
1.4 TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS.....	11
1.5 MICROENCAPSULACIÓN.....	13
<i>1.5.1 Métodos de encapsulación.....</i>	<i>13</i>
<i>1.5.2 Materiales encapsulantes</i>	<i>14</i>
<i>1.5.3 Microencapsulación de betalaínas</i>	<i>15</i>
1.6 HIPÓTESIS.....	17
1.7 OBJETIVOS.....	17
<i>1.7.1 Objetivo general</i>	<i>17</i>
<i>1.7.2 Objetivos específicos.....</i>	<i>17</i>
MATERIALES Y METODOS.....	18
2.1.- MATERIALES	18
2.2.- MÉTODOS	18
2.2.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PULPA DE TUNA	18
2.2.2 OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ULTRAFILTRADO USANDO FRACCIONAMIENTO POR MEMBRANAS	19
<i>2.2.2.1 Microfiltración</i>	<i>19</i>
<i>2.2.2.2 Ultrafiltración</i>	<i>22</i>
2.2.3 MICROENCAPSULACIÓN DE BETALAÍNAS.....	24
<i>2.2.3.1 Elaboración de micropartículas</i>	<i>24</i>
<i>2.2.3.2 Diseño experimental para la microencapsulación</i>	<i>24</i>

2.2.3.3 <i>Caracterización de las micropartículas</i>	25
2.2.4 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETALAÍNAS.....	27
2.2.5 ADICIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS EN MEZCLAS SECAS	28
2.2.5.1 <i>Elaboración y caracterización de las mezclas secas</i>	28
2.2.5.2 <i>Estudio de la estabilidad de betalaínas en las mezclas secas durante el almacenamiento a 30°C</i>	29
2.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	29
RESULTADOS Y DISCUSION	30
3.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA PULPA DE TUNA PÚRPURA (<i>OPUNTIA FICUS-INDICA</i>)	30
3.2 OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ULTRAFILTRADO USANDO FRACCIONAMIENTO POR MEMBRANAS	32
3.2.1 <i>Microfiltración (MF) de pulpa de tuna (<i>Opuntia ficus-indica</i>)</i>	32
3.2.2 <i>Ultrafiltración (UF) del permeado de MF aplicando un diseño experimental</i>	36
3.3.- MICROENCAPSULACIÓN DE BETALAÍNAS.....	41
3.3.1 <i>Microencapsulación de pulpa de tuna</i>	42
3.3.2 <i>Microencapsulación del extracto UF</i>	46
3.3.3 <i>Caracterización de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas</i> 49	
3.4.- CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS	54
3.5 ADICIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS A MEZCLAS SECAS	63
3.5.1 <i>Caracterización de las mezclas secas</i>	63
3.5.2 <i>Estabilidad de betacianinas y betaxantinas en las mezclas secas durante el almacenamiento a 30°C</i>	64
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	67

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MEMBRANAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE MICROFILTRACIÓN	20
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MEMBRANAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN	22
TABLA 3. VARIABLES INDEPENDIENTES Y NIVELES EN EL DISEÑO COMPOSITO CENTRAL MÁS PUNTO AXIAL PARA EL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN UTILIZANDO MEMBRANA POLIMÉRICA Y CERÁMICA	23
TABLA 4. VARIABLES INDEPENDIENTES Y NIVELES EN EL DISEÑO COMPOSITO CENTRAL MÁS PUNTO AXIAL PARA LA DE ENCAPSULACIÓN DE LOS SISTEMAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K	25
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE PULPA DE TUNA PÚRPURA (<i>OPUNTIA FICUS-INDICA</i>)	30
TABLA 6. PARÁMETROS DE PROCESO DE MICROFILTRACIÓN DE PULPA DE TUNA, UTILIZANDO MEMBRANA POLIMÉRICA Y CERÁMICA, A PTM 0,64 Y 0,84 BAR Y 240 MIN DE OPERACIÓN	34
TABLA 7. BALANCE DE MASA DEL PROCESO DE MICROFILTRACIÓN DE PULPA DE TUNA CON MEMBRANA CERÁMICA A PTM DE 0,64 BAR.....	35
TABLA 8. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA ALIMENTACIÓN, PERMEADO Y RETENIDO OBTENIDOS POR MF DE PULPA DE TUNA CON MEMBRANA CERÁMICA A PTM 0,64 BAR	35
TABLA 9. CONDICIONES EXPERIMENTALES Y FACTOR DE CONCENTRACIÓN (FC) DE BETACIANINAS PARA EL DISEÑO COMPOSITO CENTRAL MÁS PUNTO AXIAL APLICADO EN EL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN DEL PERMEADO DE MICROFILTRACIÓN, UTILIZANDO MEMBRANA CERÁMICA Y POLIMÉRICA.....	37

TABLA 10. BALANCE DE MASA DEL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN DE PULPA DE TUNA ULTRAFILTRADA, UTILIZANDO MEMBRANA CERÁMICA BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS	39
TABLA 11. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS SOLUCIONES DE ALIMENTACIÓN, PERMEADO Y RETENIDO OBTENIDAS POR ULTRAFILTRACIÓN CON MEMBRANA CERÁMICA BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS (8,5 BAR Y 31°C).....	40
TABLA 12. CONDICIONES EXPERIMENTALES, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS, RECUPERACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS Y RENDIMIENTO PARA EL DISEÑO COMPOSITO CENTRAL MÁS PUNTO AXIAL DE PULPA CON CAPSUL (P-C).....	44
TABLA 13. CONDICIONES EXPERIMENTALES, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS, RECUPERACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS Y RENDIMIENTO PARA EL DISEÑO COMPOSITO CENTRAL MÁS PUNTO AXIAL DE PULPA CON K4484 (P-K)	44
TABLA 14. CONDICIONES EXPERIMENTALES, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS, RECUPERACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS Y RENDIMIENTO PARA EL DISEÑO COMPOSITO CENTRAL MÁS PUNTO AXIAL DE ULTRAFILTRADO CON CAPSUL (UF-C).....	47
TABLA 15. CONDICIONES EXPERIMENTALES, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS, RECUPERACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS Y RENDIMIENTO PARA EL DISEÑO COMPOSITO CENTRAL MÁS PUNTO AXIAL DE ULTRAFILTRADO CON K4484 (UF-K)	47
TABLA 16. CONDICIONES ÓPTIMAS, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN Y RECUPERACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS, Y RENDIMIENTO DEL PROCESO PARA LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K OBTENIDOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS	49
TABLA 17. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS	51

TABLA 18. CONSTANTES DE VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS (K_{OBS}) PARA LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS Y ALMACENADAS A 30, 45 Y 60°C	58
TABLA 19. PARÁMETROS DE ARRHENIUS Y TERMODINÁMICOS DE BETACININAS Y BETAXANTINAS PARA LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS	61
TABLA 20. CONTENIDO DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS Y SOLUBILIDAD DE MEZCLAS SECAS FORMULADAS CON LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K	63
TABLA 21. RETENCIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS EN LAS MEZCLAS SECAS FORMULADAS CON LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 30°C	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO BETALÁMICO (A), BETANINA (B) E INDICAXANTINA (C) (ALLEGRA <i>ET AL.</i> , 2005; AZEREDO, 2008)	4
FIGURA 2. VÍAS DE DEGRADACIÓN DE BETANINA (MODIFICADO DE HERBACH <i>ET AL.</i> , 2006)	9
FIGURA 3. DIAGRAMA DEL MÓDULO DEL SISTEMA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANAS UTILIZADO EN MF Y UF, CONDICIÓN NO-ESTACIONARIA (<i>BATCH</i>) (1) MEMBRANA, (2) BOMBA, (3) MANÓMETROS Y (4) VÁLVULA	21
FIGURA 4. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC DE BETALAÍNAS DE PULPA DE TUNA A 484 NM (A) Y 535 NM (B). INDICAXANTINA (1), BETANINA (2) E ISOBETANINA (3).....	31
FIGURA 5. EVOLUCIÓN DEL FLUX DE PERMEADO A TRAVÉS DEL TIEMPO EN EL PROCESO DE MICROFILTRACIÓN DE PULPA DE TUNA, UTILIZANDO MEMBRANA POLIMÉRICA A PTM 0,64 (◇) Y 0,84 (□) BAR Y MEMBRANA CERÁMICA A PTM 0,64 (x) Y 0,84 (Δ) BAR A 20°C.....	33
FIGURA 6. CROMATOGRAMA OBTENIDO POR HPLC DE BETALAÍNAS A 484 NM (A) Y 535 NM (B) PARA EL PERMEADO DE MICROFILTRACIÓN DE PULPA DE TUNA, UTILIZANDO MEMBRANA CERÁMICA A PTM DE 0,64 BAR. INDICAXANTINA (1), BETANINA (2) E ISOBETANINA (3).....	36
FIGURA 7. GRÁFICO DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA EL DISEÑO APLICADO AL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN CON MEMBRANA POLIMÉRICA (A) Y CERÁMICA (B)	38
FIGURA 8. GRÁFICOS DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS:P-C (A) Y P-K (B)	45
FIGURA 9. GRÁFICOS DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS: UF-C(A) Y UF-K(B)	48

FIGURA 10. MICROFOTOGRAFÍAS DE MICROPARTÍCULAS OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LOS SISTEMAS P-C (A), P-K (B), UF-C (C) Y UF-K (D) (MAG 8.00 KX).....	52
FIGURA 11. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETACIANINAS PARA LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS: P-C(A), P-K (B), UF-C (C) Y UF-K (D), ALMACENADAS A 30°C (▲), 45°C (■) Y 60°C (◆)	54
FIGURA 12. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETAXANTINAS PARA LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS: P-C(A), P-K (B), UF-C (C) Y UF-K (D), ALMACENADAS A 30°C (▲), 45°C (■) Y 60°C (◆).	55
FIGURA 13. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC DE BETACIANINAS EN MICROPARTÍCULAS DEL SISTEMA UF-C A 535 NM ANTES (A) Y DESPUÉS (B) DEL ALMACENAMIENTO A 60°C DURANTE 160 DÍAS. BETANINA (1), COMPUESTO DESCONOCIDO (X) (2), ISOBETANINA (3)	56
FIGURA 14. EQUILIBRIO DE BETANINA EN EL SISTEMA DE MICROPARTÍCULAS UF-C, DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 60°C POR 161 DÍAS; ◇ BETANINA, □ COMPUESTO DESCONOCIDO, Δ CICLO DOPA Y × ÁCIDO BETLÁMICO.....	57
FIGURA 15. ESQUEMA EQUILIBRIO DE BETANINA EN EL SISTEMA DE MICROPARTÍCULAS UF-C DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 60°C (X: COMPUESTO DESCONOCIDO). 58	
FIGURA 16. LÍNEA ISOCINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS DESDE LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C, P-K, UF-C Y UF-K; ◆ BETACIANINAS Y ■ BETAXANTINAS	62
FIGURA 17. RETENCIÓN DE BETACIANINAS (A) Y BETAXANTINAS (B) EN EL TIEMPO A 30°C, EN MEZCLAS SECAS FORMULADAS CON LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS P-C(◆), P-K (▲), UF-C (■) Y UF-K (×)	64

ABREVIATURAS

P: Pulpa de tuna púrpura

MF: Microfiltración

UF: Ultrafiltración

PTM: Presión transmembrana

J: Flux de permeado

e_c : Eficiencia de clarificación

FC: Factor de concentración

C: agente encapsulante Capsul

K: agente encapsulante K4484

P-C: sistema de micropartículas con pulpa de tuna y Capsul

P-K: sistema de micropartículas con pulpa de tuna y K4484

UF-C: sistema de micropartículas con extracto ultrafiltrado y Capsul

UF-K: sistema de micropartículas con extracto ultrafiltrado y K4484

MSR: Metodología de Superficie Respuesta

EE: Eficiencia de encapsulación

R: Recuperación

E_a : Energía de activación

ΔH^\ddagger : Entalpía de activación

ΔS^\ddagger : Entalpía de activación

RESUMEN

Las fuentes naturales de pigmentos rojos son escasas y comúnmente se utiliza la betanina que se obtiene de la betarraga (*Beta vulgaris*). La tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) es una fuente de betalaínas, las cuales podrían utilizarse potencialmente como colorantes en la industria de alimentos. Tradicionalmente, las betalaínas se obtienen por extracción con solventes y son inestables frente a factores ambientales (luz, oxígeno, temperatura y agua) por lo cual pueden degradarse perdiendo su capacidad colorante y antioxidante.

En este contexto, la utilización de la tecnología de membranas y la encapsulación se presentan como herramientas para la obtención y protección de estos pigmentos, respectivamente. De acuerdo a estos antecedentes, el objetivo de esta tesis fue estabilizar las betalaínas del extracto obtenido por tecnología de membranas y la pulpa de tuna, utilizando microencapsulación. Para la obtención del extracto de tuna púrpura se aplicó microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF), evaluando membrana cerámica y polimérica. La MF permitió clarificar la pulpa de tuna obteniéndose mejores resultados con membrana tipo cerámica. El extracto UF correspondió a una solución clarificada (sin mucílago), con un contenido de betalaínas similar al de la pulpa, pero con un menor contenido de azúcares.

Se encapsuló extracto UF y pulpa de tuna púrpura (P) mediante secado por atomización utilizando Capsul (C) y K4484 (K) como agentes encapsulantes de acuerdo a un diseño experimental Composito central más punto axial para cada sistema de micropartículas estudiado (P-C, P-K, UF-C y UF-K). La temperatura del aire de entrada al secador y la relación (P ó UF)/agente encapsulante tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación (EE), la recuperación (R) de betacianinas y betaxantinas y el rendimiento del proceso. La condición óptima de la temperatura de secado estuvo determinada por el tipo de agente

encapsulante y la relación (P ó UF)/(C ò K) por el tipo de extracto y agente encapsulante. En los sistemas con pulpa (P-C, P-K) se incorporó menor cantidad de polímero, sugiriendo la participación del mucílago como agente encapsulante.

Todos los sistemas de micropartículas obtenidos bajo condiciones óptimas mostraron EE de betacianinas y betaxantinas sobre 98% debido a una fuerte interacción betalaínas-polímero por interacciones electrostáticas y/o formación de puentes de hidrógeno. Las recuperaciones de betacianinas y betaxantinas alcanzaron valores entre 68,5 – 77,8 % y 79,2 - 100%, respectivamente y sobre 62% de rendimiento.

Se estudió la cinética de degradación de betacianinas y betaxantinas desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, durante el almacenamiento a 30, 45 y 60°C. La degradación de betalaínas siguió una cinética de pseudo-primer orden a todas las temperaturas y sistemas estudiados. Las constantes de velocidad de degradación de betacianinas y betaxantinas fueron significativamente mayores en el sistema P-C respecto a P-K, UF-C y UF-K. No se observaron diferencias significativas en la energía, entalpía (ΔH^\ddagger) y entropía (ΔS^\ddagger) de activación entre las micropartículas de los sistemas estudiadas. Se obtuvo una relación lineal en el gráfico (ΔH^\ddagger) *versus* (ΔS^\ddagger) ($R^2=0.995$), este efecto de compensación señala que todos los sistemas de micropartículas siguieron un mismo mecanismo de degradación de betalaínas, siendo la hidrólisis el principal.

Se formuló una mezcla seca para bebida refrescante con los sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas y se evaluó su estabilidad durante el almacenamiento a 30°C. Las micropartículas obtenidas en este estudio podrían ser aplicadas como colorantes con actividad antioxidante en la industria de alimentos para el diseño de productos instantáneos como jugos, sopas entre otros, debido a su alta estabilidad y solubilidad en agua.

ABSTRACT

Natural sources of red pigments are scarce, and betanin obtained from beetroot (*Beta vulgaris*) is commonly used in the food industry. Purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) is a source of betalains, which could be used as colorant for foods. Usually, the betalains are obtained by solvent extraction and are unstable to environmental factors (light, oxygen, temperature and water) losing its colorant and antioxidant capacity.

In this context, membrane and encapsulation technologies appear as tools for obtaining and protecting, respectively, these pigments. Therefore, the aim of this thesis was to stabilize a cactus pear betalains extract obtained by membrane technology, and cactus pear pulp, using microencapsulation techniques. Microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF), was used to obtain the purple cactus pear extract, assessing ceramic and polymeric membrane. The MF allowed clarifying the cactus pear pulp, obtaining better results with the ceramic membrane. UF extract corresponded to a clarified solution (without mucilage) with similar betalains content than cactus pear pulp, but with lower sugar content.

UF extract and purple cactus pear pulp were encapsulated by spray drying using Capsul (C) and K4484 (K) as encapsulating agents, according to an experimental design (Central Composite Design (CCD) plus axial point) for each microparticles system studied (P-C, P-K, UF-C and UF-K). The inlet air temperature and the (P or UF)/encapsulating agent ratio showed significant effect on the encapsulation efficiency (EE), the betaxanthins and betacyanins recovery (R) and yield. The optimum condition of the drying temperature was dependent on the encapsulating agent, and the (P or UF)/(C or K) ratio by the extract type and encapsulating agent.

Systems with pulp (PC and PK) allowed greater amount of extract incorporation, suggesting the mucilage contribution as encapsulating agent.

The betalains (betacyanins and betaxanthins) encapsulation efficiency (EE) reached values about 98% for all the systems studied, without significant differences among the microparticle systems, revealing a high interaction betalain-polymer due to electrostatic interactions and/or hydrogen bond. The recovery (R) of betacyanins and betaxanthins was between 68.5 to 77.8 % and 79.2 to 100%, respectively, and over 62% yield.

The betaxanthins and betacyanins degradation kinetics of microparticles obtained under optimum conditions during storage at 30, 45 and 60 °C was studied. Betalains followed pseudo-first order degradation kinetics in all temperatures and systems studied. The degradation rate constants of betaxanthins and betacyanins were significantly higher in P-C system compared with P-K, UF-C and UF-K. No significant difference in the activation energy, enthalpy (ΔH^\ddagger) and entropy (ΔS^\ddagger) between the microparticles systems studied was observed. A linear relationship was obtained in the graph gráfico (ΔH^\ddagger) versus (ΔS^\ddagger) ($R^2=0.995$), this compensation effect showed that there is a similar betalains degradation mechanism in all microparticles systems, being hydrolysis the main pathway.

A dry mix for soft drinks was formulated with microparticles obtained under optimum conditions of each system studied, and the storage stability was evaluated at 30 °C. The microparticles obtained in this study could be applied as a colorant with antioxidant activity in the food industry for the formulation of instant products such as juices or soups, among others, due to its high stability and solubility in water.

INTRODUCCION

El color es uno de los atributos más importantes en los alimentos y se considera un indicador de calidad y aceptabilidad (Azeredo, 2008). Durante el procesamiento y/o almacenamiento, los alimentos son susceptibles a perder color, por lo cual la industria de alimentos utiliza colorantes para resaltar, recuperar o uniformar el color original.

Los colorantes pueden ser de origen natural ó artificial, siendo estos últimos los más utilizados. Sin embargo, las regulaciones oficiales de la Unión Europea y EEUU han restringido el uso de colorantes artificiales debido a sus posibles efectos adversos sobre la salud (Tsuda *et al.*, 2001; Amin *et al.*, 2010). En la actualidad existe un creciente interés en el desarrollo, utilización y consumo de colorantes naturales (Stintzing y Carle, 2004; Moßhammer *et al.*, 2007).

Las betalaínas son pigmentos naturales hidrosolubles que podrían ser utilizados potencialmente como colorantes (rojos y amarillos), que poseen además actividad antioxidante (Tesoriere *et al.*, 2003; 2004a-b y 2005; Cai *et al.*, 2005; Allegra *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008). Estos pigmentos son particularmente escasos en la naturaleza; se encuentran en la betarraga (*Beta vulgaris L. spp. vulgaris*), semillas y hojas de amaranto (*Amaranthus* sp.) y en algunas cactáceas del genero *Opuntia* y *Hylocereus*, como la tuna púrpura, las pitayas y pitahayas (Cai y Corke, 1998; Stintzing *et al.*, 2002; Vaillant *et al.*, 2005).

Las betalaínas usualmente se extraen con solvente (agua, etanol y metanol) con o sin aplicación de temperatura (Delgado Vargas *et al.*, 2000). Una alternativa es la aplicación de tecnología de membranas, utilizando bajas temperaturas para obtener extractos con diferentes características físicas y químicas (libre de mucílagos ó con menor contenido de azúcares).

Estos pigmentos son inestables frente a factores ambientales como luz, oxígeno, pH y temperatura, entre otros (Castellar *et al.*, 2003; Stintzing *et al.*, 2005; Moßhammer *et al.*, 2005; Herbach *et al.*, 2006; Azeredo, 2008), por lo cual pueden degradarse perdiendo sus atributos de color y capacidad antioxidante. En este contexto, la utilización de la tecnología de encapsulación se presenta como una herramienta para proteger y mejorar la estabilidad de las betalainas.

Considerando los antecedentes anteriores y que la pulpa y extracto ultrafiltrado de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) tendrían diferentes contenidos de azúcares y mucílago, esta tesis se enfocó a evaluar el efecto del tipo de extracto y agente encapsulante sobre la encapsulación y la estabilidad de las betalainas en las micropartículas.

1.1 Compuestos bioactivos de la tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*)

La tuna es el fruto del nopal, el cual pertenece a la familia de las Cactáceas, subgénero *Opuntia* crece en regiones áridas y semiáridas (Pimienta-Barrios y del Castillo, 2002). En el mundo se conocen aproximadamente 300 especies, las que son originarias del continente americano y se encuentran distribuidas ampliamente en México, presentes 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 utilizada es *Opuntia ficus-indica* que se caracteriza por tener frutos dulces, jugosos, de distintos colores (púrpura, rojo, anaranjado o amarillo), con abundante pulpa, numerosas semillas y cáscara generalmente delgada, cubierta de pequeños grupos de espinas (Sáenz, 2006). El ecotipo verde es bien conocido y cultivado desde hace años en Chile y en otras regiones del mundo (Tesoriere *et al.*, 2005; Castellar *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, los ecotipos púrpuras son menos cultivados y consumidos, debido a que poseen pobres características texturales.

Tanto los frutos como los cladodios de la tuna son fuente de compuestos 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 (frutos anaranjados); también minerales, como calcio y potasio y algunas 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).

En el ecotipo púrpura los pigmentos responsables del color son las betalaínas, los cuales derivan del ácido betalámico (Figura 1 A) y son solubles en agua. Se clasifican principalmente en dos grupos: las betacianinas, responsables del color rojo-púrpura y las betaxantinas, de coloración amarillo-anaranjado. En las betacianinas el ácido betalámico está unido al grupo 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), que puede estar o no glicosilado, mientras que en las betaxantinas está unido con aminoácidos o derivados aminos. Ambos pigmentos absorben a distintas longitudes de onda; las betacianinas a 535-550 nm y las betaxantinas a 475-480 nm en el rango de luz visible (Allegra *et al.*, 2005; Sáenz, 2006; Forni *et al.*, 1992; Delgado Vargas *et al.*, 2000; Castellar *et al.*, 2003).

Dentro de las betacianinas de la tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) se han identificado principalmente la betanina (Figura 1 B) y en menores niveles la isobetanina (Sáenz *et al.*, 2009). Dentro de las betaxantinas se ha identificado sólo la indicaxantina (Figura 1 C) (Butera *et al.*, 2002; Fernández-López *et al.*, 2002; Castellar *et al.*, 2003; Allegra *et al.*, 2005). Betacianinas y betaxantinas 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). En otras variedades de tuna púrpura, como *Opuntia undulata*, se ha identificado la presencia de los mismos compuestos, mientras que en *Opuntia stricta* solamente se han detectado betacianinas, betanina e isobetanina (Fernández-López *et al.*, 2002; Castellar *et al.*, 2003).

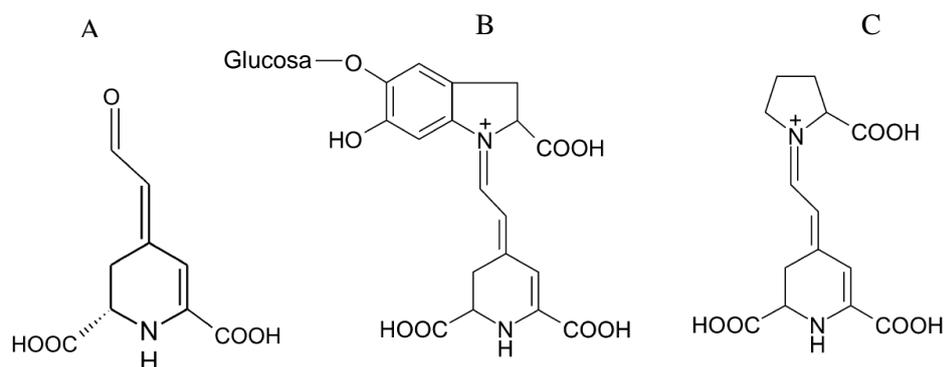


Figura 1. Estructura química del ácido betalámico (A), betanina (B) e indicaxantina (C) (Allegra *et al.*, 2005; Azeredo, 2008)

En tunas púrpuras (*Opuntia ficus-indica*) cultivadas en Chile, el contenido de betacianinas presente en el fruto entero (con cáscara) fluctúa entre 16,6 y 62,4 mg 100 g⁻¹ expresado como betanina (Sepúlveda *et al.*, 2003). Otros estudios reportan que el contenido de betanina en *Opuntia ficus-indica* varía entre 14 y 19 mg 100 g⁻¹ (Forni *et al.*, 1992; Castellar *et al.*, 2003; Fernández-López *et al.*, 2002). Estudios recientes, han reportado diversos contenidos tanto de betanina como de indicaxantina en pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*). Sáenz *et al.* (2009) encontraron contenidos de 28,09 mg 100 g⁻¹ de betacianinas expresadas como betanina y 9,96 mg 100 g⁻¹ de betaxantinas expresadas como indicaxantina. Otros autores han informado 41,05 mg 100 g⁻¹ y 18,65 mg 100 g⁻¹ de betacianinas y betaxantinas, respectivamente (Stintzing *et al.*, 2005). El contenido de betalaínas depende del cultivar o variedad, madurez, clima y procedencia del fruto (Odoux y Domínguez-López, 1996; Stintzing y Carle, 2004; Sáenz, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2003).

Actualmente, la betarraga (*Beta vulgaris*) es la fuente comercial de betanina, la cual se utiliza como colorante natural en la industria de alimentos desde hace años (Serris y Biliaderis, 2001). La betanina, también llamada “rojo-betarraga” se encuentra aceptada en diversas legislaciones y clasificada como aditivo E-162 (EU) y 73.40 (FDA, EEUU). Se utiliza principalmente para colorear alimentos que no son tratados térmicamente, como yogurt, helados, jarabes, etc. (Lozano, 2009; Díaz *et al.*, 2006; Forni *et al.*, 1992). La tuna púrpura comparada con la betarraga al ser una fruta y no una raíz, presenta considerables ventajas tecnológicas y sensoriales, no contiene

nitratos, es más aromática, no posee el olor presente en la betarraga debido a la geosmina y el 3 sec-butil-2-metoxipirazina, no muestra toxicidad y sus pigmentos no provocan ninguna reacción alérgica (Butera *et al.*, 2002; Piga, 2004; Stintzing *et al.*, 2001 y 2005). Así, la pulpa de tuna púrpura es una alternativa para la producción de betanina, que no necesitaría una nueva certificación, ya que son los mismos pigmentos de la betarraga (Castellar *et al.*, 2006).

Además, la tuna púrpura posee compuestos fenólicos, lo cual también contribuye a la actividad antioxidante (Butera *et al.*, 2002; Galati *et al.*, 2003; Kuti, 2004; Tesoriere *et al.*, 2005; Stintzing *et al.*, 2005). El ecotipo púrpura (*Opuntia ficus-indica*), es el que presenta la mayor concentración de polifenoles totales, alrededor de 660 mg L⁻¹ de jugo (Stintzing *et al.*, 2005). Otros autores han reportado valores más elevados del orden de 777,4 mg L⁻¹ y 900 mg L⁻¹ de pulpa (Sáenz *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2008).

1.2 Importancia biológica de las betalainas y otros compuestos bioactivos de la tuna

La tuna es una fruta que está siendo considerada como un alimento de importancia nutracéutica y funcional, ya que posee constituyentes conocidos como funcionales y promotores de la salud (Piga, 2004). Varios autores han reportado que las betalainas (betanina e indicaxantina) presentes en tuna púrpura poseen actividad antioxidante, por lo que su consumo se asocia a la protección contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Stintzing *et al.*, 2005; Butera *et al.*, 2002; Tesoriere *et al.*, 2005). La actividad antioxidante de las betalainas se atribuye al grupo fenólico y grupo amino cíclico presentes en su estructura, por lo cual podrían donar átomos de hidrógeno y/o electrones a radicales libres (Kanner *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2008). En betacianinas la glicosilación reduce la actividad antioxidante. Además la estructura 6-*O*-glicosilada produce valores más elevados que la 5-*O*-glicosilada y la posición C-5 de los grupos hidroxilo en agliconas mejora la actividad antioxidante (Kanner *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003 y 2005). La naturaleza catiónica de las betalainas favorecería la interacción de estas moléculas solubles en agua con

moléculas polares de las membranas y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Kanner *et al.*, 2001).

La evidencia científica describe beneficios del consumo de la tuna, como efectos antiulcerosos y efectos hepatoprotectores en ratas (Galati *et al.*, 2003; Livrea y Tesoriere, 2006). Diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* muestran que las betaxantinas y betacianinas poseen actividad antioxidante en ambientes biológicos como membranas celulares y células (Tesoriere *et al.*, 2003; 2004a-b; 2005; Allegra *et al.*, 2005). También se han evidenciado acciones antiinflamatorias en células endoteliales y efectos sobre células de líneas tumorales (Gentile *et al.*, 2004; Sreekantah *et al.*, 2007). Wu *et al.* (2006) reportaron que las betalaínas presentes en frutos de pitaya roja tienen un fuerte poder inhibitorio sobre la proliferación de células cancerígenas *in vitro*. Gentile *et al.* (2004) observaron que las betalaínas protegen células endoteliales contra la oxidación, lo que indicaría un efecto protector contra procesos inflamatorios conducentes a problemas cardiovasculares posteriores.

Investigaciones en seres humanos han demostrado que el consumo de pulpa de tuna puede disminuir el estrés oxidativo en individuos sanos y que la betanina y la indicaxantina son altamente biodisponibles. Además se detectó la incorporación de betalaínas en LDL, lo que sugiere que tanto betanina como indicaxantina pueden participar en la protección del LDL contra modificaciones oxidativas (Tesoriere *et al.*, 2004a y 2005).

Pruebas clínicas mostraron que el consumo de la fruta influye positivamente en el balance redox del organismo disminuyendo el daño oxidativo de los lípidos, en tanto que la ingesta de jugo de betarraga retarda la oxidación de los lípidos, efectos que se atribuyen a las betalaínas (Moreno *et al.*, 2008). Los estudios *in vivo* que han sido reportados coinciden en señalar que las betalaínas estarían relacionadas con diversos efectos protectores contra procesos oxidativos en el organismo, contribuyendo por lo tanto a prevenir la incidencia de enfermedades no transmisibles.

La tuna púrpura posee compuestos fenólicos, los cuales presentan propiedades antioxidantes en sistemas biológicos que se atribuyen a su capacidad para inactivar radicales libres y quelar metales. Se han descrito mecanismos por: donación de un átomo de hidrógeno a través de la ruptura homolítica del enlace O-H y transferencia de electrones (Leopoldini *et al.*, 2011). En pulpa de tuna de diversos ecotipos se han identificado polifenoles como: quercetina, kaempferol y derivados de isoramnhetina (Kuti, 2004), isoramnhetina-3-rutinosido, rutina y kaempferol-3-rutinosido entre otros (Galati *et al.*, 2003). La tuna púrpura es la variedad que contiene mayor cantidad de flavonoides totales y valores ORAC (Kuti, 2004; Stintzing *et al.*, 2005).

1.3 Estabilidad de las betalaínas

1.3.1 Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas

La estabilidad es un factor importante a considerar para la utilización de estos pigmentos como colorantes y/o antioxidantes en alimentos. La estabilidad de las betalaínas ha sido estudiada en pigmentos obtenidos de betarraga (von Elbe *et al.*, 1974; Sapers y Hornstein., 1979; Delgado Vargas *et al.*, 2000; Herbach *et al.*, 2006; Azeredo, 2008), en betalaínas de tuna púrpura (Butera *et al.*, 2002; Castellar *et al.*, 2003, Stintzing *et al.*, 2005; Moßhammer *et al.*, 2005; Herbach *et al.*, 2006; Azeredo, 2008) y en betalaínas de amaranto (Cai y Corke, 1998 y 2000). Se ha establecido que los principales factores que influyen en la estabilidad de las betalaínas son: temperatura, pH, actividad de agua, luz, presencia o ausencia de oxígeno y de metales, acción enzimática, siendo la temperatura el factor más influyente en la degradación de las betalaínas (Herbach *et al.*, 2006).

- **Temperatura:** La degradación de las betalaínas depende de la temperatura y sigue una cinética de reacción de primer orden, dependiente del pH (Huang y von Elbe., 1985; Castellar *et al.*, 2003). Al calentar soluciones de betanina se produce una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento con la aparición de pardeamiento (von Elbe *et al.*, 1974).
- **pH:** las betalaínas son estables en el rango de pH entre 3,5-7, rango en el que se encuentran la mayoría de los alimentos (Delgado Vargas *et al.*, 2000; Castellar

et al., 2003; Stintzing *et al.*, 2005), fuera de este rango el color decrece. El pH óptimo para la estabilidad de las betalaínas de betarraga, en presencia de oxígeno se encuentra a pH 5,5-5,8, mientras que en condiciones anaeróbicas a pH 4,0-5,0 (Huang y von Elbe, 1985).

- **Actividad de agua (a_w):** Las betalaínas presentan mayor estabilidad en alimentos o sistemas modelo con un bajo contenido de humedad y a_w , debido a que el agua está menos disponible para que ocurran reacciones químicas. Valores de a_w por debajo de 0,63 mejoran la estabilidad de la betanina de betarraga (Delgado Vargas *et al.*, 2000). Además, métodos para reducir la a_w , como la concentración y el secado por atomización han demostrado proporcionar estabilidad a las betalaínas, en pigmentos provenientes de tuna púrpura (*Opuntia stricta*) (Castellar *et al.*, 2006) y de amaranto Cai y Corke, 2000).
- **Luz:** Existe una relación inversa entre la estabilidad de las betalaínas de betarraga y la exposición a la luz. La degradación de betalaínas sigue una cinética de primer orden que es oxígeno dependiente, ya que los efectos de la exposición a la luz son insignificantes bajo condiciones anaerobias (Attoe y von Elbe, 1981). Otros autores, observaron que la adición de 0,1% de ácido isoascórbico y 1% de ácido ascórbico a jugo de betarraga y pitaya inhibió la degradación inducida por la luz durante el almacenamiento de betacianina (Bilyk *et al.*, 1981; Herbach *et al.*, 2006).
- **Oxígeno:** Según lo observado por Attoe y von Elbe (1985), en betalaínas de betarraga, estas reaccionan con el oxígeno molecular, causando el oscurecimiento del producto y la pérdida del pigmento. La estabilidad de la betanina disminuye linealmente con el aumento en la concentración de oxígeno (Czapski, 1990) siguiendo una cinética de primer orden en presencia de oxígeno, pero en ausencia de oxígeno su comportamiento se desvía de este modelo. Se ha recomendado que para aumentar la estabilidad del pigmento es necesario colocar las muestras en atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno, incorporando antioxidantes (Attoe y von Elbe, 1985; Han *et al.*, 1998) o utilizando atmósferas con nitrógeno (Attoe y von Elbe, 1982 y 1985; Drunkler *et al.*, 2006).

1.3.2 Vías de degradación de las betalainas

La degradación de betacianinas se ha descrito especialmente para betanina (Herbach *et al.*, 2004 y 2006). La Figura 2 muestra las posibles vías de degradación de betanina, asociando los productos de degradación con el color que presentará cada compuesto.

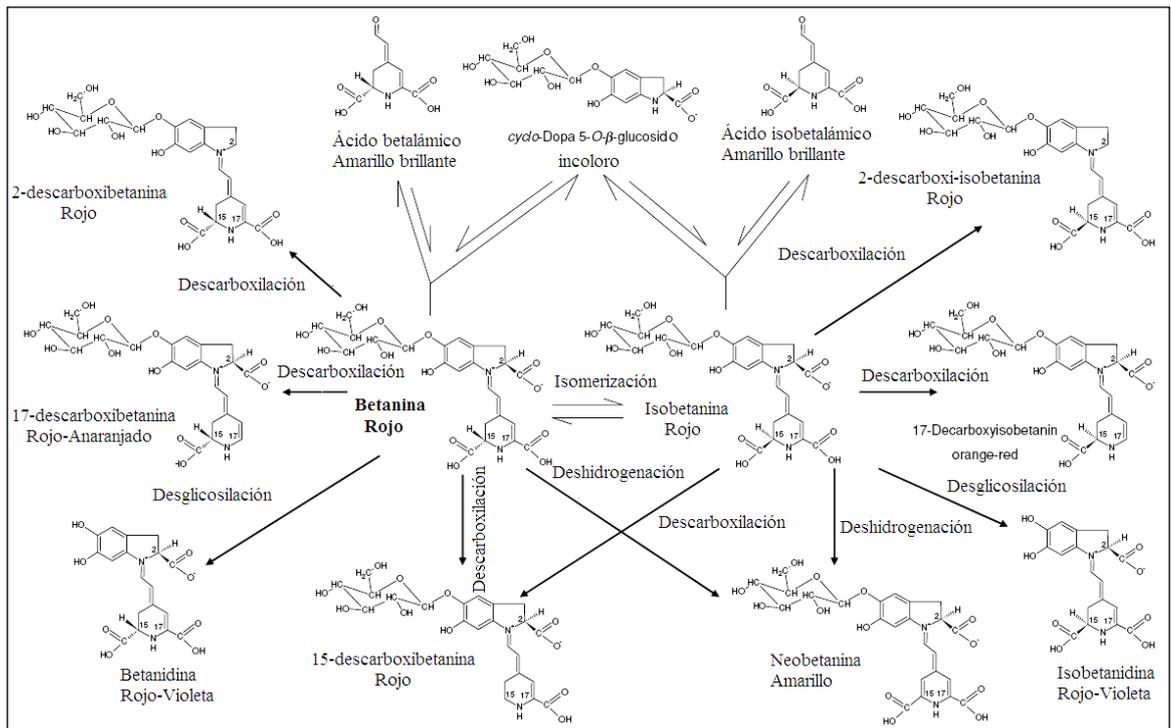


Figura 2. Vías de degradación de betanina (modificado de Herbach *et al.*, 2006)

Las principales vías de degradación que se han descrito son: isomerización, descarboxilación, desglicosilación, deshidrogenación e hidrólisis, las cuales se describen a continuación:

- Isomerización:** la isomerización se considera una modificación estructural más que una reacción de degradación. Las betacianinas están siempre acompañadas de su isómero en relaciones variables dependiendo del tipo de fuente. La betanina se isomeriza en el carbono C₁₅ a isobetanina, la cual presenta propiedades cromáticas idénticas a la betanina. Se ha observado que la isomerización se produce en condiciones ácidas, alcalinas y en tratamientos térmicos (von Elbe *et al.*, 1981; Herbach *et al.*, 2004 y 2006). El ácido betalámico y la indicaxantina son

susceptibles a isomerización y la indicaxantina también es susceptible a epimerización en C₁₁ (Herbach *et al.*, 2006).

- **Desglicosilación:** 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:** La hidrólisis de la betanina se produce por la ruptura hidrolítica del enlace aldimina, esta ruptura se ha observado en tratamientos térmicos y en condiciones de 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 (incolora) (Herbach *et al.*, 2006). La ruptura del enlace aldimina es reversible con una condensación de base de Schiff y pH dependiente (reacción favorecida a pH 6) (Huang y von Elbe, 1985 y 1987). Se ha observado recondensación de ácido betalámico y ciclo-Dopa a betanina después de cortos tratamientos térmicos (bajas temperaturas) (Huang y von Elbe, 1985).
- **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 ser explicado por una disminución en la deslocalización de los electrones π (Herbach *et al.*, 2006). Varios estudios han corroborado que la betanina puede ser descarboxilada en las posiciones C₂, C₁₅ y/o C₁₇. No obstante, cuando la descarboxilación ocurre en C₂ y C₁₅ se puede considerar una ventaja ya que se mantienen las características cromáticas de su precursor, la betanina, mientras que cuando ocurre en el C₁₇ esas características cambian (compuesto de coloración (rojo-anaranjado) (Herbach *et al.*, 2006).
- **Deshidrogenación:** Reacciones de deshidrogenación de betacianinas generan el compuesto llamado neobetanina que se caracteriza por ser de color amarillo. La formación de neobetanina se ha confirmado en jugo de betarraga sometido a un tratamiento térmico bajo condiciones anaeróbicas (Herbach *et al.*, 2004).

1.4 Tecnología de membranas

En la industria de alimentos, la tecnología de membranas se ha utilizado con diversos objetivos, incluyendo pasteurización en frío y clarificación de jugos. En comparación con los métodos tradicionales de separación y concentración, la tecnología de membranas se presenta como un proceso factible e innovador para trabajar con pigmentos como las betalainas. Es una tecnología de un costo accesible, que trabaja a bajas temperaturas (15-35 °C) evitando la degradación de compuestos sensibles al calor (Pap *et al.*, 2010) y no requiere del uso de agentes químicos (Cassano *et al.*, 2010)

El potencial de la tecnología de membranas radica en su capacidad para concentrar (remover agua) y/o fraccionar en dos o más componentes una mezcla. El proceso se fundamenta en que la membrana actúa como una barrera selectiva permitiendo el paso de ciertos componentes y reteniendo otros desde una mezcla, bajo un gradiente de presión hidrostática. La separación se lleva a cabo principalmente por diferencias de tamaño (Cheryan, 1998). Los procesos tradicionales de tecnología de membranas en la industria de alimentos son la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y la osmosis reversa (RO). Los materiales de membrana se clasifican principalmente en dos tipos, poliméricos y cerámicos, con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, dependiendo de la aplicación.

Los procesos de tecnología de membranas seleccionados para aplicar en este estudio fueron MF y UF. La MF trabaja en el rango de separación de 10 µm hasta 0,1µm aproximadamente, y normalmente se utiliza en la industria de alimentos para la clarificación, pasteurización en frío o separación de caseínas (Cancino *et al.*, 2008; Espina *et al.*, 2010). La UF trabaja en un rango de 0,05µm hasta 1 kDa, y se utiliza para separar macromoléculas, proteínas y clarificar diferentes tipos de jugos (Cissé *et al.*, 2011; Cassano *et al.*, 2010 y 2007; Rai *et al.*, 2006; Todisco *et al.*, 2002). Cada proceso, dependerá del tamaño de partícula, propiedades químicas de las soluciones filtradas, distribución del tamaño de poro y de las propiedades químicas de la membrana (Raventós, 2005). Sin embargo, una de las limitantes de los procesos de membranas es el ensuciamiento de la membrana que se produce a medida que se

concentra el producto y aumenta la viscosidad, lo cual limita el grado de concentración que se puede alcanzar y el tiempo de proceso.

En los procesos de membrana se pueden identificar tres flujos: el de alimentación, el retenido o concentrado y el permeado. El retenido o concentrado es la solución que no pasa a través de la membrana, mientras que el permeado es el flujo obtenido cuando la solución pasa a través de la membrana y se representa como el flux de permeado (J_p ; el flujo de permeado se divide por la superficie de la membrana utilizada). La ecuación 1 muestra el modelo de resistencia para explicar el comportamiento entre la presión transmembrana (P_T) y el J_p (Cheryan, 1998; Cancino *et al.*, 2009).

$$J = \frac{P_T - \Delta\Pi}{\mu R_T} \quad (\text{Ec. 1}) \quad R_T = R_m + R_f + R_{cp}$$

(Ec. 2)

donde:

$\Delta\Pi$, es la presión osmótica de la solución, la que es importante cuando se usa RO o NF. La viscosidad (μ) del fluido es dependiente de la temperatura. R_T es la resistencia total que se describe en la ecuación 2 la que incluye la resistencia de la membrana (R_m), resistencia al ensuciamiento (R_f) y resistencia de concentración de polimerización (R_{cp}).

La tecnología de membrana se ha utilizado para obtener betalaínas como colorante preservando su estabilidad durante el proceso de separación. La UF se ha aplicado a jugo de betarraga con membranas poliméricas (Real y Cerezal, 1995; Bayindirli *et al.*, 1988). Por otro lado, en jugo de tuna amarilla se compararon membranas poliméricas para MF y UF (Cassano *et al.*, 2010). No se registran trabajos en los que se separen o concentren las betalaínas de tuna púrpura mediante esta tecnología. Sin embargo, su uso sería interesante ya que permitiría obtener un extracto de betalaínas de tuna libre de mucílago, con menor contenido de azúcares de bajo peso molecular, evitando el uso de temperaturas elevadas y la degradación de los pigmentos.

1.5 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.*, 2002).

Para definir el método de encapsulación y el agente encapsulante más apropiado es importante definir: cuál será la aplicación de las micropartículas, la composición de los ingredientes, el mecanismo de liberación, tamaño de partícula, forma física final y el costo, entre otros (Desai y Park, 2005).

1.5.1 Métodos de encapsulación

Algunas de las técnicas usadas para microencapsulación son: secado por atomización, liofilización, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, atrapamiento por liposomas, coacervación (Gibbs *et al.*, 1999; Santinho *et al.*, 2002), inclusión, extrusión centrifuga, suspensión rotacional, separación y polimerización interfacial (Wang *et al.*, 2004) entre otros. La selección del método de encapsulación se basa en los costos, en las propiedades del material a encapsular, en el tamaño deseado de las micropartículas, en la aplicación y en el mecanismo de liberación (Pedroza, 2002).

El secado por atomización es el método de encapsulación más utilizado en la industria de alimentos para encapsular compuestos activos y proteger materiales, de forma económica, simple y continua (Ré, 1998; Desai y Park, 2005; Gharsallaoui *et al.*, 2007), siendo seleccionado en este estudio como método de encapsulación. Mediante esta técnica la solución o dispersión de alimentación se atomiza (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). Una de las ventajas de esta técnica además de su

simplicidad es su utilidad para encapsular materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (Gibbs *et al.*, 1999; Gouin, 2004).

Mediante este método es posible obtener micropartículas en polvo con baja actividad de agua lo que facilita el transporte, manipulación, almacenamiento del producto y permite asegurar la calidad microbiológica (Hayashi, 1989). Las variables más importantes del proceso son la temperatura y el flujo de alimentación, la temperatura del aire de entrada al secador y la temperatura de salida del producto (Liu *et al.*, 2004). La temperatura de ingreso del aire es proporcional a la velocidad de evaporación (velocidad de secado) y al contenido final de agua de las micropartículas. Temperaturas de ingreso bajas producen micropartículas más húmedas y con facilidad para aglomerarse. Temperaturas muy altas causan excesiva evaporación, lo cual lleva a fracturas de las micropartículas exponiendo al activo encapsulado a una degradación ó liberación anticipada (Zakarian y King, 1982). En algunos equipos de laboratorio la temperatura de salida del aire no puede ser directamente controlada y depende de la temperatura de ingreso (Shu *et al.*, 2006). Por ello resulta muy conveniente la aplicación de diseños estadísticos para analizar la influencia de estos parámetros y optimizar el proceso.

1.5.2 Materiales encapsulantes

Se ha estudiado una gran variedad de materiales encapsulantes para aplicaciones en alimentos, sin embargo, es importante considerar características como la solubilidad en agua, permeabilidad, facilidad de aplicación, baja viscosidad en soluciones concentradas y naturaleza hidrofóbicas o hidrofílicas de los mismos. Todos estos factores influirán en las características del producto final (Gibbs *et al.*, 1999).

Como materiales encapsulantes se han utilizado: carbohidratos (almidones de diferentes fuentes: papa, arroz, maíz, entre otros) (Loksuwan, 2007), maltodextrinas de diferente equivalente de dextrosa (ED) (Wagner y Wathersen, 1995; Desobry *et al.*, 1997), ciclodextrinas, carboximetilcelulosa; proteínas (Chen *et al.*, 2006);,gelatina (Robert *et al.*, 2003), caseinatos (Hogan *et al.*, 2001; Santinho *et al.*,

2002), aislado proteico de soja, suero de leche, zeína y aislado proteico de suero (Kim y Morr, 1996; Dziezak, 1998); grasas; gomas (goma arábica, goma mezquita); alginato de sodio, carragenina y quitosano (Souza *et al.*, 2005). En general, estos agentes encapsulantes han mostrado una función protectora sobre el agente activo contra el daño oxidativo, siendo la estabilidad del activo dependiente del tipo de agente encapsulante (Robert *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha reportado que el mucílago del nopal presenta propiedades encapsulantes (Medina-Torres *et al.*, 2013). El mucílago es una mezcla compleja de polisacáridos con estructura similar a las pectinas (<50%) y está compuesto por una fracción insoluble (44,3 %) formada por ácido urónico, xilosa, ramnosa, y galactosa, y una fracción soluble (15,6 %) compuesta por ácido urónico, arabinosa y galactosa. La pulpa de tuna contiene aproximadamente 3,8% de éste hidrocoloide (Matsuhiro *et al.*, 2006).

Los agentes encapsulantes utilizados en este estudio fueron Capsul y K4484. El Capsul es un almidón modificado químicamente derivado del maíz, que incorpora a su estructura un componente lipofílico, presentando tanto propiedades hidrofílicas como hidrofóbicas. Solubiliza completamente en agua a temperaturas sobre 82°C, tiene muy baja viscosidad y su pH varía entre 3 y 4. El K4484 es una dextrina de tapioca con alta solubilidad en agua a temperaturas sobre 70°C.

1.5.3 Microencapsulación de betalaínas

La microencapsulación de betalaínas ha sido poco estudiada. Se han realizado estudios mediante secado por atomización para jugo de betarraga con goma arábica (Pitalua *et al.*, 2010); extracto de betarraga con maltodextrina (10ED) (Azeredo *et al.*, 2007) y maltodextrina (20ED) (Ravichandran *et al.*, 2012); extractos de amaranto con maltodextrinas y almidón (Cai y Corke, 2000); extracto de indicaxantina con maltodextrina (Gandía-Herrero *et al.*, 2010); pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) y su extracto hidroalcohólico con maltodextrina, inulina (Tapia, 2007; Sáenz *et al.*, 2009) y mezclas de aislado proteico de soja con maltodextrina e inulina

(Torres, 2008). Y por liofilización para jugo de betarraga con pululano y maltodextrina (5 y 20 ED) (Serris y Biliaderis, 2001) y

Otros trabajos se relacionan con la obtención de polvos colorantes a partir de diferentes fuentes sin la formación de micropartículas. *Opuntia ficus-indica* cv. Giolla (tuna amarilla) por liofilización y secado por atomización usando como *carrier* maltodextrina (18-20 ED) (Moßhammer *et al.*, 2006); diferentes tunas púrpuras (*Opuntia stricta*, *Opuntia streptacantha*, *Opuntia lasiacantha*) mediante secado por atomización utilizando como ayudantes de secado maltodextrina (10, 20 ED) (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2006) o jarabe de glucosa (29 ED) (Obón *et al.*, 2009).

Las betalaínas pueden ser usadas como ingredientes en la industria de alimentos, específicamente en la industria láctea y de bebidas refrescantes (Moßhammer *et al.*, 2005 y 2006). Obón *et al.* (2009) aplicó un colorante obtenido de jugo de *Opuntia stricta* en yogurt y bebida refrescante. Los alimentos presentaron una tonalidad rojo-púrpura muy atractiva para los consumidores, que no varió después de un mes de refrigeración. Torres (2008) estudió la adición de micropartículas de compuestos bioactivos obtenidos de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) en yogurt manteniendo un alto porcentaje de retención de betalaínas y un color púrpura intenso durante todo el periodo de estudio (30 días a 5°C).

1.6 Hipótesis

La velocidad de degradación de betalaínas desde micropartículas de un extracto de betalaínas de tuna púrpura (ultrafiltrado), obtenido usando tecnología de membrana, será menor con respecto a las micropartículas de pulpa de tuna. Este comportamiento se espera tanto para el almacenamiento de las micropartículas en polvo como en mezclas secas.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Estabilizar las betalaínas de tuna púrpura obtenidas por tecnología de membranas y la pulpa de tuna, utilizando microencapsulación.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la pulpa de tuna púrpura por análisis físicos y químicos.
2. Estudiar el fraccionamiento de betalaínas desde tuna púrpura, usando tecnología de membranas, considerando en la ultrafiltración temperatura y presión transmembrana como las variables independientes y el factor de concentración de betacianinas como la variable dependiente, aplicando un diseño Composito central más punto axial optimizado por Metodología de Superficie Respuesta (MSR).
3. Estudiar la relación (pulpa ó extracto UF)/agente encapsulante (Capsul ó K4484) y la temperatura de secado (variables independientes) sobre la eficiencia de encapsulación y la recuperación de betacianinas y betaxantinas, y el rendimiento del proceso (variables dependientes) aplicando un diseño Composito central más punto axial optimizado por MSR.
4. Caracterizar física, química y morfológicamente las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para cada extracto y agente encapsulante estudiado.
5. Estudiar la estabilidad de las betalaínas desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas a tres temperaturas (30, 45 y 60°C).
6. Adicionar las micropartículas con betalaínas en sistemas de alimentos modelos (mezclas secas) y estudiar su estabilidad a 30°C.

MATERIALES Y METODOS

2.1.- Materiales

Los frutos de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) se obtuvieron del Jardín de variedades de la Estación Experimental “Antumapu” (cosecha 2011), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Santiago (Latitud - 33° 34' 10.24", Longitud -70° 38' 6.22"). Los agentes encapsulantes: Capsul (almidón ceroso de maíz modificado) y K4484 (dextrina de tapioca) se obtuvieron de National Starch, S.A.

2.2.- Métodos

2.2.1 Preparación y caracterización de pulpa de tuna

La pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) se obtuvo trozando las tunas previamente peladas y procesándolas en una pulpadora de tornillo sin fin, provista de un tamiz de 2 mm. La pulpa se envasó en bolsas de polipropileno de 500 g y se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para caracterizar la pulpa de tuna se realizaron los siguientes análisis:

- **Humedad, sólidos solubles (°Brix), pH y acidez:** se determinaron de acuerdo a los métodos descritos en AOAC (1996).
- **Contenido de azúcares totales:** se determinó a través del método de Antrona (Osborne y Voogt, 1986), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK), a una longitud de onda de 620 nm (Anexo 2).
- **Contenido e identificación de betalaínas (betacianinas y betaxantinas):** el contenido se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Stintzing *et al.* (2005) (Anexo 3), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK). La identificación de las betalaínas (betacianinas y

betaxantinas) se realizó por HPLC de acuerdo a Fernández-López y Almela (2001) (Anexo 4).

- **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 determinaron en el sobrenadante.
- **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 5).
- **Turbidez:** se determinó usando un turbidímetro Hanna (Modelo HI 93703) (USA).

2.2.2 Obtención de un extracto ultrafiltrado usando fraccionamiento por membranas

Se realizaron dos procesos de filtración por membranas, microfiltración seguida por ultrafiltración.

2.2.2.1 Microfiltración

La microfiltración (MF) se utilizó con el objetivo de clarificar la pulpa de tuna púrpura, por lo tanto, el permeado obtenido del proceso fue el flujo de interés de esta etapa. La solución de alimentación para MF fue pulpa de tuna diluida en agua destilada (1:1). Se evaluaron dos tipos de material de membrana: cerámica y polimérica. En la Tabla 1 se presentan las características de las membranas utilizadas para MF. Todas las experiencias de MF se realizaron en un módulo en condición no-estacionaria (*batch*), retirando el permeado del sistema. La Figura 3 muestra el diagrama del módulo utilizado para el proceso de MF.

Tabla 1. Características de las membranas utilizadas en el proceso de microfiltración

Características	Membrana Polimérica	Membrana Cerámica
Material y denominación	Polisulfona, GRM 0.1PP	TiO ₂ +ZrO ₂
Proveedor	Alfa Laval – Denmark	Tami - France
Tamaño de poro (μm)	0,2	0,2
Area (m ²)	0,0104	0,0047
Configuración	Plana en forma de disco	Monotubular
Resistencia de la membrana (m ⁻¹) *	2,50 · 10 ¹²	2,46 · 10 ¹¹

*Resistencia de la membrana se calculó experimentalmente a 20 °C con agua destilada (conductividad menor a 10 μS/cm), de acuerdo al método descrito por Cancino-Madariaga *et al.* (2011).

En el proceso de MF se alimentaron 3 L de pulpa diluida en agua a 20°C. La temperatura se controló utilizando un RESUN Chiller model C-1500 y el flujo de permeado se midió utilizando una balanza Shimadzu Co. balance (BX 4200). Se evaluaron 2 condiciones de presión transmembrana (PTM), 0,64 y 0,84 bar, para membrana polimérica y cerámica, respectivamente; el tiempo de proceso fue de 240 min para cada tipo de membrana y condición de PTM estudiada. La alimentación se impulsó por bombas de desplazamiento positivo, modelo PA411 para membrana cerámica y PA2511 para membrana polimérica (Fluid-o-Tech, US).

El proceso de MF se evaluó en términos del flujo de permeado (g/h), Flux de permeado (J , m³/m² s) (ecuación 3), eficiencia de clarificación (e_c , %) (ecuación 4), recuperación de masa de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) (RM, %) (ecuación 5), recuperación en concentración de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) (RC, %) (ecuación 6) y razón de reducción del volumen (VRR) (ecuación 7).

$$J = \frac{P_T}{\mu R_T} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde, P_T es la presión transmembrana, μ es la viscosidad y R_T es la resistencia total de la membrana.

$$e_c(\%) = \left(1 - \frac{NTU_p}{NTU_a}\right) \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde, NTU_p y NTU_a son la turbidez del permeado y la turbidez de la solución de alimentación, respectivamente.

$$RM(\%) = \frac{m_p}{m_a} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde, m_p y m_a son la masa de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) en el permeado y la masa de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) en la solución de alimentación, respectivamente.

$$RC(\%) = \frac{C_p}{C_a} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde, C_p y C_a son la concentración de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) en el permeado y la concentración de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) en la solución de alimentación, respectivamente.

$$VRR = \frac{V_a}{V_c} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde, V_a y V_c son el volumen de alimentación al inicio del proceso y el volumen de concentrado al final del proceso, respectivamente.

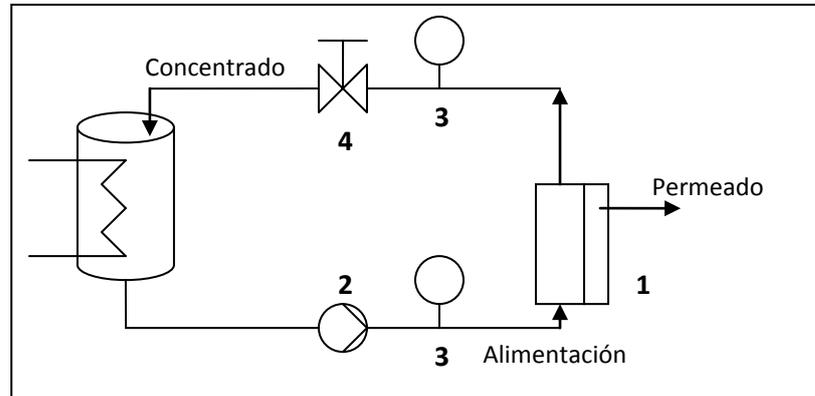


Figura 3. Diagrama del módulo del sistema de filtración por membranas utilizado en MF y UF, condición no-estacionaria (batch) (1) Membrana, (2) bomba, (3) manómetros y (4) válvula

Caracterización del permeado de microfiltración

La caracterización física y química de los flujos de alimentación, retenido y permeado se realizó determinando:

- Humedad, sólidos solubles (°Brix), pH, acidez, contenido de azúcares totales, contenido e identificación de betalaínas (betacianinas y betaxantinas), parámetros de color (L, a*, b*, C* y h°), contenido de polifenoles totales y turbidez de acuerdo a los métodos descritos en la sección 2.2.1.

2.2.2.2 Ultrafiltración

Para el proceso de ultrafiltración (UF) se utilizó como alimentación el permeado obtenido en la etapa anterior por MF (membrana cerámica; 0,64 bar). El flujo de interés en esta etapa correspondió al retenido. Se evaluaron dos tipos de material de membrana: polimérica y cerámica. La Tabla 2 muestra las características de las membranas utilizadas en el proceso de UF. Todas las experiencias de UF se realizaron en un módulo en condición no-estacionaria (*batch*), retirando el permeado del sistema (Figura 3).

Como solución de alimentación se utilizó el permeado de MF (1,5 L). La temperatura de proceso (19-31°C) se controló utilizando un RESUN Chiller model C-1500. El flujo de permeado se midió utilizando una balanza Shimadzu Co. balance (BX 4200). El tiempo de proceso fue de 100 min para cada tipo de membrana y condición de temperatura y PTM estudiada. La alimentación se impulsó por bombas de desplazamiento positivo, modelo PA411 para membrana cerámica y PA2511 para membrana polimérica (Fluid-o-Tech, US).

Tabla 2. Características de las membranas utilizadas en el proceso de ultrafiltración

Características	Membrana polimérica	Membrana cerámica
Material y denominación	PVDF+celulosa, ETNA 0,1PP	TiO ₂ +ZrO ₂
Proveedor	Alfa laval- Denmark	Tami - France
Tamaño molecular (kDa)	1	1
Area (m ²)	0,0104	0,013
Configuración	Plana en forma de disco	Multi tubular (7 canales)
Resistencia de la membrana(m ⁻¹) *	1,88 · 10 ¹³	2,03 · 10 ¹³

*Resistencia de la membrana se calculó experimentalmente a 20 °C con agua destilada (conductividad menor a 10 µS/cm), de acuerdo al método descrito por Cancino-Madariaga *et al.* (2011).

2.2.2.2.1 Diseño experimental para ultrafiltración

Se aplicó un diseño Composito central más punto axial con un total de 12 experimentos (4 puntos experimentales, 4 puntos axiales y 4 puntos centrales), para cada tipo de material de membrana estudiado (polimérica y cerámica). Las variables independientes fueron la temperatura (X_1) y la presión transmembrana (X_2) (Tabla 3). La variable respuesta fue el factor de concentración (FC) de betacianinas calculado de acuerdo a la ecuación 8. Para optimizar la variable respuesta se aplicó Metodología de Superficie Respuesta (MSR).

$$FC = \frac{C_c}{C_a} \quad (\text{Ec.8})$$

Donde C_c y C_a son la concentración de betacianinas en el concentrado y la solución de alimentación, respectivamente.

Tabla 3. Variables independientes y niveles en el diseño composito central más punto axial para el proceso de ultrafiltración utilizando membrana polimérica y cerámica

Variables independientes		Niveles				
		-2	-1	0	1	2
Temperatura (°C)	X_1	19	20	25	30	31
Presión Transmembrana (bar)	X_2	1,2	1,8	4,9	7,9	8,5

2.2.2.2.2 Caracterización del extracto de UF obtenido bajo condiciones óptimas

La caracterización física y química del extracto UF, que correspondió al flujo de retenido de UF obtenido bajo condiciones óptimas se realizó determinando:

- Humedad, sólidos solubles (°Brix), pH, acidez, contenido de azúcares totales, contenido e identificación de betalaínas (betacianinas y betaxantinas), parámetros de color (L , a^* , b^* , C^* y h°), contenido de polifenoles totales y turbidez de acuerdo a los métodos descritos en la sección 2.2.1.

2.2.3 Microencapsulación de betalaínas

2.2.3.1 Elaboración de micropartículas

Las micropartículas de pulpa de tuna (P) y extracto ultrafiltrado (UF) se prepararon por secado por atomización, utilizando Capsul (C) y K-4484 (K) como agentes encapsulantes (P-C, P-K, UF-C y UF-K).

Para la elaboración de las micropartículas se consideraron 100 g de dispersión de alimentación. C y K (5,5-51,72 g) se disolvieron en agua destilada (64,5 – 18,28 g) 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 P ó UF (30 g). Finalmente la dispersión se homogeneizó por 3 minutos con un homogeneizador Polytron PT 2100 a 11000 rpm. Las soluciones resultantes se alimentaron a un mini secador B-290 (Suiza), con alimentación y flujo de aire en paralelo. Las condiciones de secado fueron: temperatura del aire de entrada al secador 133-219°C para los sistemas con Capsul (P-C y UF-C) y 110-217°C para los sistemas con K4484 (P-K y UF-K). El flujo de aire, la razón de alimentación y la presión de atomización fueron 600 L/h, 3 mL/min (5%) y 5 bar, respectivamente para todos los sistemas estudiados. Las micropartículas obtenidas fueron almacenadas en oscuridad y a -20°C hasta ser analizadas.

2.2.3.2 Diseño experimental para la microencapsulación

Se aplicó un diseño Composito central más punto axial con un total de 12 experimentos (4 puntos experimentales, 4 puntos axiales y 4 puntos centrales) para cada sistema estudiado (P-C, P-K, UF-C y UF-K). Las variables independientes fueron la relación (P ó UF)/agente encapsulante (K ó C) (X_1) y la temperatura del aire de entrada al secador (X_2). Las variables dependientes o respuesta correspondieron a la eficiencia de encapsulación (EE) y recuperación (R) de betacianinas y betaxantinas, y rendimiento del proceso. Para la optimización se utilizó MSR, aplicando la función deseabilidad. Esta función permite asignar un puntaje entre 0 y 1 a un set de variables respuestas donde 1 representa la maximización de cada variable (en el caso de este estudio 1 representaría 100% de

eficiencia de encapsulación y recuperación de betacianinas y betaxantinas y del rendimiento del proceso).

En la Tabla 4 se presentan las variables independientes y los niveles del diseño experimental utilizado para la encapsulación de los sistemas de pulpa y ultrafiltrado con Capsul y K4484 (P-C, P-K, UF-C y UF-K).

Tabla 4. Variables independientes y niveles en el diseño Composito central más punto axial para la de encapsulación de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K

Variables independientes		Niveles				
		-2	-1	0	1	2
Relación (P ó UF)/agente encapsulante (K ó C)	X ₁	0,58:1	1:1	3:1	5:1	5,42:1
Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	C	133	140	175	210	219
	K	110	120	165	210	217

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; C: Capsul; K: K4484

2.2.3.3 Caracterización de las micropartículas

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 y actividad de agua:** se realizaron de acuerdo a AOAC, (1996).
- **Higroscopicidad:** Se determinó de acuerdo al método descrito por Cai y Corke (2000). Las micropartículas de cada sistema (P-C, P-K, UF-C, UF-K) (2 g), se colocaron en vidrios reloj y en un desecador sellado herméticamente, que contenía una solución saturada de Na₂SO₄, a 25 °C y una humedad relativa de 93 %. Después de una semana se pesó cada uno de los seis sistemas. Los resultados se expresaron como g de humedad por 100 g de sólidos secos (g/100 g).
- **Contenido betalaínas totales:** se pesaron micropartículas (100 mg) de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K y se adicionaron 2 mL de metanol:ácido acético:agua (50:8:42 v/v/v), se agitó en un vortex (1 min), se sonicó por 50 min y luego se centrifugo a 11200g por 5 min. El contenido de betalaínas

(betacianinas y betaxantinas) se cuantificó espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.* (2005) (Anexo 3).

- **Contenido de betalaínas superficiales:** se pesaron micropartículas (200 mg) de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K y se adicionaron 2 mL de etanol:metanol (1:1 v/v) la solución fue agitada en un vortex (1 min) y luego centrifugada a 11200 g por 5 min. El contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) se cuantificó espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.*(2005) (Anexo 2).
- **Eficiencia de encapsulación (EE) y Recuperación (R) de betalaínas:** EE y R de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 9 y 10, respectivamente.

$$EE(\%) = \frac{\text{Contenido de betalaínas totales} - \text{contenido betalaínas superficiales}}{\text{Contenido de betalaínas totales}} \times 100 \quad (\text{Ec. 9})$$

$$R(\%) = \frac{\text{Contenido de betalaínas totales}}{\text{Contenido de betalaínas teóricas}} \times 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

- **Morfología 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, UK) operado a 20 kV. Las imágenes se obtuvieron digitalmente utilizando un software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford, UK).

- **Tamaño de partícula**

El tamaño de las partículas se midió mediante difracción de luz láser (DLL) en un equipo MastersizerX (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), con un lente de 300 mm. Las muestras se dispersaron en propilenglicol antes de medir el patrón de difracción.

2.2.4 Cinética de degradación de betalaínas

Las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (P-C, P-K, UF-C y UF-K) se almacenaron a 30, 45 y 60 ± 0,1 °C en estufa con aire forzado (Memmert modelo UFE 500, Alemania) y en oscuridad. Se pesaron 100 mg de las micropartículas de cada sistema estudiado en tubos de ensayo de vidrio sin tapa (16 x 100 mm). Se cuantificó betalaínas (betacianinas y betaxantinas) retirando de la estufa tubos en triplicado de la siguiente manera: a 30 °C se tomaron muestras cada 7 días durante 1,5 meses, luego cada 15 días durante 2 meses y cada 2 meses durante 7,5 meses. A 45 °C y 60 °C se tomaron muestras cada 7 días durante 1,5 meses, luego cada 15 días durante 2 meses y cada 1 mes durante 3 meses. Los datos obtenidos se ajustaron a modelos cinéticos de primer orden de acuerdo a la ecuación 11.

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (\text{Ec.11})$$

Donde, C es la cantidad de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) a tiempo t , C_0 es la cantidad inicial de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) en las micropartículas y k es la constante de velocidad de degradación de primer orden.

La energía de activación (E_a) y factor de frecuencia (A) se determinaron a través del modelo de Arrhenius de acuerdo a la ecuación 12.

$$k = A e^{[-E_a / RT]} \quad (\text{Ec.12})$$

Donde k es la constante de velocidad, E_a es la energía de activación, A es el factor de frecuencia, R es la constante de los gases (8,314 J/mol K ó 1,987 cal/mol K) y T es la temperatura absoluta (°K).

La entalpía de activación (ΔH^\ddagger) y entropía de activación (ΔS^\ddagger) se obtuvieron de la pendiente e intercepto de un gráfico de $\ln(k/T)$ vs. $(1/T)$, respectivamente (ecuación 13).

$$\ln(k/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^\ddagger / R - \Delta H^\ddagger / RT \quad (\text{Ec.13})$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann ($1,4 \times 10^{-23}$ J/K), h es la constante de Planck ($6,6 \times 10^{-34}$ Js), R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, ΔH^\ddagger es la

entalpía de activación (J/mol) y ΔS^\ddagger la entropía de activación (J/mol K) (Robert *et al.*, 2003).

La cuantificación de las betalaínas (betacianinas y betaxantinas) se realizó espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.* (2005) (Anexo 3).

2.2.5 Adición de las micropartículas en mezclas secas

2.2.5.1 Elaboración y caracterización de las mezclas secas

Se formularon mezclas secas para bebida compuestas por sacarosa (86 g/L), micropartículas (9,8 g/L), saborizante de frambuesa (0,5 g/L), ácido cítrico (1,5 g/L), sorbato de potasio (0,18 g/L), benzoato de sodio (0,14 g/L) y ácido ascórbico (0,02 g/L) (Obón *et al.*, 2009).

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” y se determinó que el tiempo óptimo de mezcla fue 12 minutos (Anexo 6).

Cada formulación de mezcla seca elaborada con los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K, se caracterizó de acuerdo a los siguientes análisis:

- **Contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas):** se cuantificaron por espectrofotometría de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.* (2005) (Anexo 3).
- **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.

2.2.5.2 Estudio de la estabilidad de betalaínas en las mezclas secas durante el almacenamiento a 30°C

El estudio de estabilidad de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) para las mezclas secas elaboradas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K, se realizó pesando 100 mg de cada mezcla seca en tubos de ensayo de vidrio sin tapa (16x100 mm) los cuales se almacenaron en estufa con aire forzado y oscuridad a 30°C. Se tomaron muestras (en triplicado) cada 7 días durante 1,5 meses, luego cada 15 días durante 2 meses y cada 1 mes durante 2 meses. Se cuantificó el contenido de betacianinas y betaxantinas de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Stintzing *et al.* (2005) (Anexo 3).

2.2.6 Análisis estadísticos

Las condiciones óptimas para cada diseño (ultrafiltración y encapsulación) se obtuvieron mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR). Para determinar las constantes de velocidad de degradación de betacianinas y betaxantinas, la energía de activación, entalpía de activación y entropía de activación se empleó regresión lineal. Para determinar diferencias estadísticas entre los sistemas estudiados para los parámetros de microfiltración, el factor de concentración de betacianinas, la eficiencia de encapsulación de betacianinas y betaxantinas, la recuperación de betacianinas y betaxantinas, el rendimiento del proceso de secado, las constantes de velocidad de degradación y los parámetros termodinámicos, se aplicó análisis de varianza y la prueba de rango múltiple de Tuckey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics versión 7.0 (Manugistics Inc., Statistical Graphics Corporation, 1993, Rockville, MA, USA).

Esta Tesis forma parte del proyecto Fondecyt N° 1110126 “Cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) colorants obtained by membrane technologies separation and microencapsulation. Stability and applications in food”

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.- Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*)

En la Tabla 5 se muestran las características físicas y químicas de la pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*). Los parámetros de humedad, sólidos solubles, azúcares totales, pH y acidez estuvieron dentro del rango informado por otros autores para estos parámetros en pulpa de tuna púrpura de la misma especie (Sáenz y Sepúlveda, 2001; Piga, 2004; Stintzing *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2008; Sáenz *et al.*, 2009).

Tabla 5. Características físicas y químicas de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*)

Parámetro	Pulpa de tuna púrpura (X ± DS)
Humedad (%)	86,1 ± 0,2
Sólidos solubles (°Brix a 20°C)	14,0 ± 0,1
Azúcares totales (%)	13,2 ± 0,0
pH	6,3 ± 0,1
Acidez (% ácido cítrico)	0,036 ± 0,001
Turbidez (NTU)	2453,4 ± 64,2
Parámetros de color	
L	12,5 ± 0,9
a*	43,2 ± 1,2
b*	21,0 ± 1,5
C*	48,0 ± 1,7
H°	25,9 ± 1,0
Betacianinas (mg EB/L)	254,0 ± 0,2
Betaxantinas (mg EI/L)	85,4 ± 0,1
Polifenoles totales (mg EAG/L)	534,8 ± 4,4

NTU: unidad de turbidez nefelométrica; EB: expresado como equivalente a betanina; EI: expresado como equivalente a indicaxantina; EAG: equivalente de ácido gálico; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3).

El contenido de betacianinas y betaxantinas obtenidos en la pulpa fueron mayores a los informados por Morales *et al.* (2008), de 111,0 mg EB/L y 29,3 mg EI/L y menores a los descritos por Stintzing *et al.* (2005) de 431 mg/L y 195,8 mg/L, respectivamente y por Sáenz *et al.* (2009) de 280,1 mg/L y 99,6 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 la pulpa fue menor al descrito por Stintzing *et al.* (2005) de 660 mg EAG/L y por Sáenz *et al.* (2009) de 909,47 mg EAG/L. Estas diferencias se pueden atribuir a factores como la temporada de cosecha, cultivar o variedad, madurez, clima y procedencia, entre otros, que afectan el contenido de betalaínas y polifenoles (Odoux y Domínguez-López, 1996; Stintzing y Carle, 2004; Sáenz, 2006; Sepúlveda *et al.*, 2003; Miletic *et al.*, 2012).

En la Figura 4 (A y B) se presentan los cromatogramas HPLC obtenidos para la identificación de betalaínas en pulpa de tuna a 480 y 535 nm, respectivamente. Los peaks 2 y 3 corresponden a betanina e isobetanina, respectivamente, mientras que el peak 1 corresponde a indicaxantina, resultados que están de acuerdo con lo informado por otros autores para la misma especie de tuna (Fernández-López y Almela, 2001; Sáenz *et al.*, 2009).

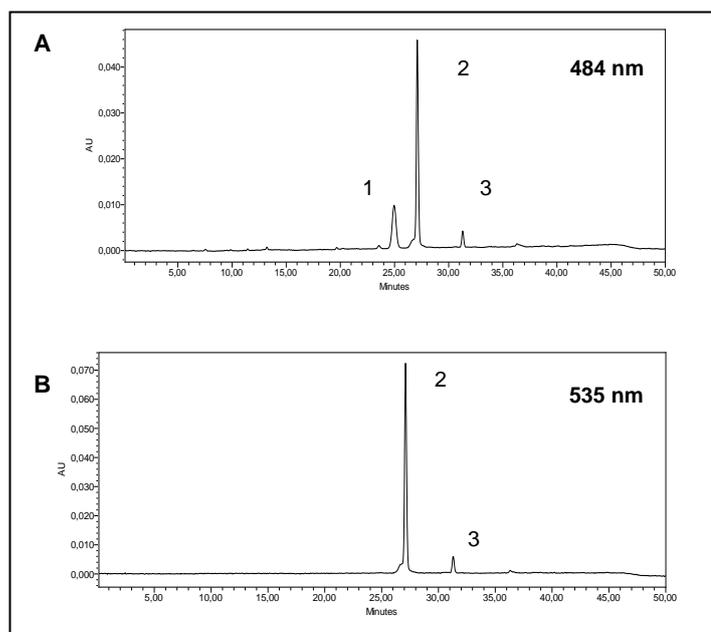


Figura 4. Cromatogramas obtenidos por HPLC de betalaínas de pulpa de tuna a 484 nm (A) y 535 nm (B). Indicaxantina (1), betanina (2) e isobetanina (3)

3.2 Obtención de un extracto ultrafiltrado usando fraccionamiento por membranas

3.2.1 Microfiltración (MF) de pulpa de tuna (*Opuntia ficus-indica*).

La Figura 5 muestra la evolución del Flux de permeado (J) durante el tiempo de proceso de MF para membrana cerámica y polimérica, a PTM 0,64 y 0,84 bar. Se observa una caída en J los primeros 50 min para ambas PTM y ambos tipos de material de membrana, que se atribuye al ensuciamiento de la membrana con moléculas de gran tamaño como el mucílago presente en la pulpa (Sáenz *et al.*, 2004; Matsuhira *et al.*, 2006) que son retenidas por la membrana formando una capa gel. Este comportamiento de polarización-concentración de la membrana es responsable de la disminución de J en el proceso (Girard y Fukumoto, 2000). Por otro lado, entre los 50 y 240 min se observó que la evolución de J a lo largo del proceso se mantuvo constante. Un comportamiento similar describieron Cassano *et al.* (2010) en la MF de jugo despectinizado de tuna amarilla usando membrana polimérica. Los valores de J fueron significativamente mayores a menor PTM, tanto para membrana cerámica como polimérica, lo cual se atribuye a la menor compactación del mucílago sobre la superficie de la membrana. También se observa (Fig. 5) el efecto del tipo de material de membrana, dado que se obtuvieron valores de J significativamente mayores cuando el proceso de MF se realizó con membrana tipo cerámica. Este resultado se atribuye a que la membrana cerámica tiene una resistencia significativamente menor que la membrana polimérica.

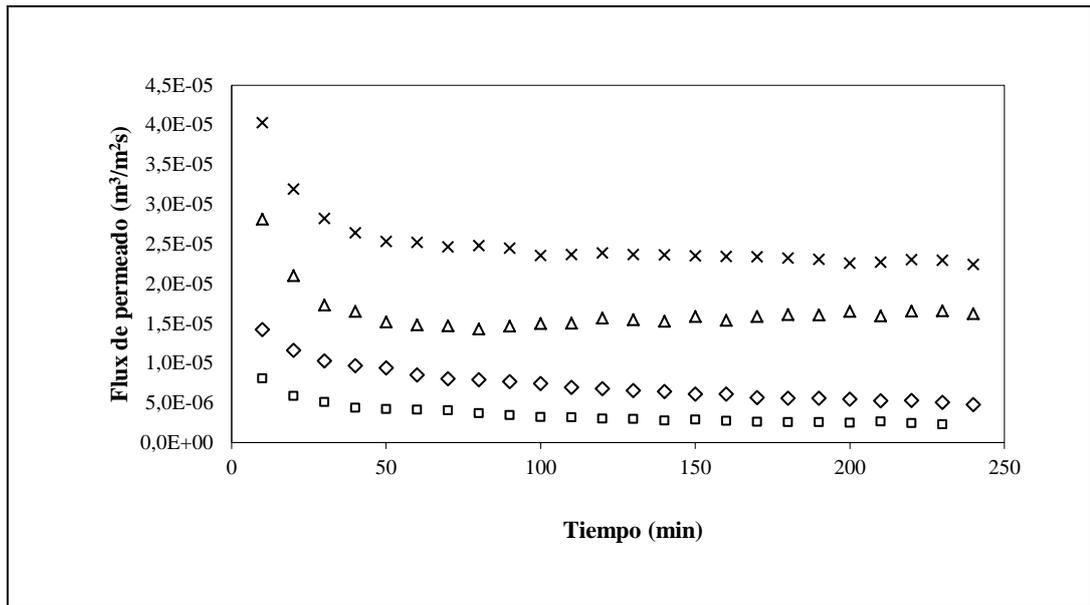


Figura 5. Evolución del Flux de permeado a través del tiempo en el proceso de microfiltración de pulpa de tuna, utilizando membrana polimérica a PTM 0,64 (◇) y 0,84 (□) bar y membrana cerámica a PTM 0,64 (x) y 0,84 (Δ) bar a 20°C.

La Tabla 6 muestra los parámetros de proceso para la MF en membrana cerámica y polimérica para ambas condiciones de PTM estudiadas. En todas las condiciones se obtuvieron permeados completamente clarificados (0 NTU y e_c 100%). Se obtuvieron valores de flujo de permeado, J_{240} , MR y VRR significativamente mayores ($p < 0,05$) a condición de PTM menor tanto para membrana cerámica y polimérica. Un comportamiento similar reportó Carvalho y da Silva (2010) al ultrafiltrar jugo de piña con membrana polimérica. En cuanto al tipo de material de membrana, se observa que con membrana cerámica se alcanzaron los valores mayores de flujo de permeado, J_{240} , RM y VRR.

Tabla 6. Parámetros de proceso de microfiltración de pulpa de tuna, utilizando membrana polimérica y cerámica, a PTM 0,64 y 0,84 bar y 240 min de operación

Membrana / PTM (bar)	Polimérica		Cerámica	
	0,64	0,84	0,64	0,84
Turbidez (NTU)	0,0 ±0,0 a	0,0 ±0,0 a	0,0 ±0,0 a	0,0 ±0,0 a
e _c (%)	100±0,0 a	100±0,0 a	100±0,0 a	100±0,0 a
Flujo de permeado (g/h)	140,0±0,0 b	127,5±0,0 b	210,0±0,0 a	140,0±0,0 b
J ₂₄₀ (m ³ /m ² s)	5,44·10 ⁻⁶ c	2,50·10 ⁻⁶ d	2,30·10 ⁻⁵ a	1,13·10 ⁻⁵ b
RC (% EB)	62,0±0,3 b	69,5±0,9 a	70,2±0,5 a	67,4±0,0 a
RC (% EI)	60,6±5,8 b	72,7±0,1 a	70,7±3,3 a	66,6±0,0 b
RM (% EB)	13,2±0,1 b	10,3±0,2 b	20,6±0,1a	12,8±0,0 b
RM (% EI)	13,4±1,1 b	10,7±0,01b	20,4±0,8 a	13,1±0,0 b
VRR	1,2±0,0 b	1,2±0,0 b	1,4±0,0 a	1,2±0,0 b

NTU: unidad de turbidez nefelométrica; e_c (%): eficiencia de clarificación del permeado; J₂₄₀: flux de permeado a 240 min de operación; RC (%EB): recuperación en concentración de betalaínas expresado como betanina; RC (%EI): recuperación en concentración de betalaínas expresado como indicaxantina; RM (%EB): recuperación de masa de betalaínas expresado como betanina; RM (%EI): recuperación de masa de betalaínas expresado como indicaxantina; VRR: razón de reducción del volumen; a – b: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre membranas para cada PTM (p < 0,05).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el proceso de MF se seleccionó la membrana cerámica a una condición PTM 0,64 bar para continuar el estudio en la etapa siguiente de UF de modo que el permeado del proceso de MF será el que se utilizará como alimentación del proceso de UF.

- **Balance de masa del proceso y caracterización del permeado de microfiltración**

En la Tabla 7 se presenta el balance de masa del proceso de MF con membrana cerámica a PTM de 0,64 bar. El retenido alcanzó sobre un 70% de retención de betalaínas (betacianinas y betaxantinas), lo cual sugiere que el mucílago que es retenido por la membrana, al tener gran capacidad de absorber agua retiene también gran parte de las betalaínas (Sáenz *et al.*, 2004; Matsuhira *et al.*, 2006). En el permeado se obtuvo una recuperación de un 20% de betalaínas respecto de la alimentación. Sin embargo, el permeado a pesar de tener un bajo contenido de betalaínas presenta la ventaja de corresponder a una solución clarificada (libre de mucílago).

Tabla 7. Balance de masa del proceso de microfiltración de pulpa de tuna con membrana cerámica a PTM de 0,64 bar

Parámetro	Alimentación	Permeado	Retenido	Pérdida
Masa (g)	3000	840 (28%)*	2000 (67%)*	5%
Betacianinas (mg EB)	395,1	81,5 (21%)*	291,4 (74%)*	5%
Betaxantinas (mg EI)	146,1	29,2 (20%)*	104,6 (72%)*	8%
Polifenoles totales (mg EAG)	590,1	218,2 (37%)*	241,5 (41%)*	22%

EB: expresado como betanina; EI: expresado como indicaxantina; EAG: equivalente de ácido gálico; * % respecto a la masa de alimentación

La Tabla 8 muestra las características físicas y químicas de la alimentación permeado y retenido obtenidos en MF utilizando membrana cerámica a PTM 0,64 bar.

Tabla 8. Características físicas y químicas de la alimentación, permeado y retenido obtenidos por MF de pulpa de tuna con membrana cerámica a PTM 0,64 bar

Parámetro	Alimentación (Pulpa:agua (1:1)) ($\bar{X} \pm DS$)	Permeado ($\bar{X} \pm DS$)	Retenido ($\bar{X} \pm DS$)
Sólidos solubles (°Brix a 20°C)	7,1±0,5a	6,9±0,2 a	7,1±0,3 a
Azúcares totales (%)	6,6±0,0 a	7,2±0,9 a	7,3±0,0 a
pH	6,4±0,2 a	6,7± 0,1 a	6,8±0,1 a
Acidez (% ácido cítrico)	0,020±0,00 c	0,056 ±0,003 a	0,035±0,01 b
Densidad (g/mL)	1,046±0,021 a	1,017±0,04 a	1,021±0,03a
Turbidez (NTU)	1226,7±64,3 b	0,0±0,0 c	2283,3±56 a
Parámetros de color			
L	21,2±0,5 b	30,5±0,1 a	17,6±0,5 c
a*	54,4±0,7 b	66,9±0,2 a	49,2±0,7 c
b*	33,9±0,6 a	33,2±0,3 a	28,6±0,7 b
C*	64,1±0,9 b	74,7±0,0 a	56,9±1,0 c
h°	32,0±0,1 a	26,4±0,2 c	30,2±0,3 b
Betacianinas (mg EB/L)	131,7±1,1 b	97,0±0,2 c	145,7±0,1 a
Betaxantinas (mg EI/L)	48,7±0,7 b	34,7±0,1 c	52,3±0,1 a
Polifenoles totales (mg EAG/L)	196,7±0,0 b	245,3±4,0 a	120,8±8,9 c

NTU: unidad de turbidez nefelométrica; EB: expresado como betanina; EI: expresado como indicaxantina; EAG: equivalente de ácido gálico; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); a, b, c: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre alimentación, permeado y retenido para cada parámetro (p < 0,05).

En la Figura 6 (A y B) se presentan los cromatogramas HPLC de betalaínas a 480 y 535 nm, respectivamente, para el permeado obtenido en proceso de MF de pulpa de tuna utilizando membrana cerámica y PTM 0,64 bar. Los peaks identificados

coinciden con los que presenta la pulpa de tuna púrpura (Fig.4), no observándose la aparición de compuestos de degradación a estas longitudes de onda.

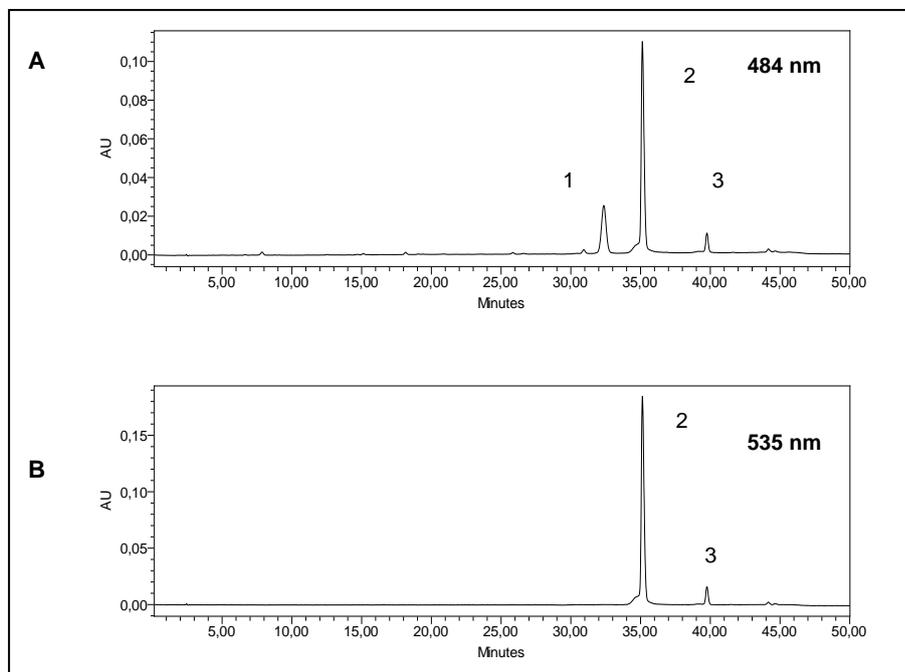


Figura 6. Cromatograma obtenido por HPLC de betalínas a 484 nm (A) y 535 nm (B) para el permeado de microfiltración de pulpa de tuna, utilizando membrana cerámica a PTM de 0,64 bar. Indicaxantina (1), betanina (2) e isobetanina (3).

3.2.2 Ultrafiltración (UF) del permeado de MF aplicando un diseño experimental

En la Tabla 9 se presentan las condiciones experimentales y el factor de concentración (FC) de betacianinas para el diseño Composito central más punto axial aplicado en el proceso de UF del permeado de microfiltración de pulpa de tuna, utilizando membrana cerámica y polimérica.

El FC se calculó en el flujo del retenido, variando entre 0,6 y 2,5 para membrana cerámica y entre 0,4 y 1,6 en membrana polimérica. Los valores de FC entre experimentos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada membrana estudiada. Se observó un aumento en los valores de FC cuando se utilizó membrana

cerámica, siendo el FC significativamente mayor ($p < 0,05$) en el experimento 7, donde la condición de temperatura (30°C) y PTM (7,9 bar) fueron altas.

Tabla 9. Condiciones experimentales y factor de concentración (FC) de betacianinas para el diseño composito central más punto axial aplicado en el proceso de ultrafiltración del permeado de microfiltración, utilizando membrana cerámica y polimérica

Experimento	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	PTM (bar)	FC betacianinas	
			Membrana Cerámica ($\bar{X} \pm \text{DS}$)	Membrana Polimérica ($\bar{X} \pm \text{DS}$)
1	19	4,9	$1,0 \pm 0,00$	$0,8 \pm 0,04$
2	20	1,8	$1,3 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,06$
3	20	7,9	$1,5 \pm 0,00$	$1,6 \pm 0,03$
4	25	1,2	$1,0 \pm 0,00$	$0,4 \pm 0,01$
5	25	8,5	$1,6 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,03$
6	30	1,8	$1,1 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,01$
7	30	7,9	$2,5 \pm 0,11$	$1,5 \pm 0,01$
8	31	4,9	$1,1 \pm 0,00$	$0,9 \pm 0,01$
9	25	4,9	$0,6 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,02$
10	25	4,9	$0,8 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,01$
11	25	4,9	$0,7 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,01$
12	25	4,9	$0,7 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,01$

FC: factor de concentración; X: promedio; DS: desviación estándar ($n = 3$)

Para la optimización del FC en membrana cerámica y polimérica se utilizó Metodología de Superficie Respuesta (MSR). El criterio general para determinar el ajuste de la variable respuesta fue el coeficiente de determinación (R^2 -ajustado corregido por grados de libertad) y la obtención de residuales bajos (< 6) (Romero y Zuñica, 2005). Se consideró la forma lineal, cuadrática y la interacción para las variables independientes estudiadas a un nivel $p < 0,05$.

En la Figura 7 (A y B) se muestran los gráficos de Superficie Respuesta de los diseños Composito central para el proceso de UF con membrana cerámica y polimérica, respectivamente.

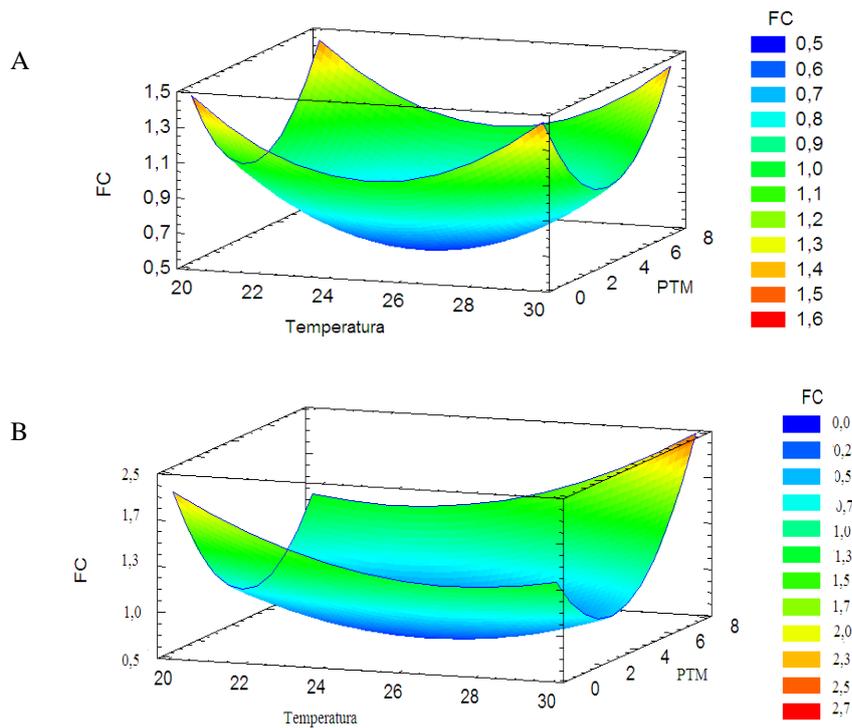


Figura 7. Gráfico de Superficie Respuesta para el diseño aplicado al proceso de ultrafiltración con membrana polimérica (A) y cerámica (B)

La membrana polimérica se descartó respecto de la cerámica primeramente porque el coeficiente de determinación (R^2 -ajustado corregido por grados de libertad) para el diseño experimental con membrana polimérica fue 44%. En segundo lugar, porque el diseño para membrana polimérica mostró un bajo ajuste y valores significativamente menores ($p < 0,05$) de FC respecto a membrana cerámica.

El diseño para membrana cerámica tuvo un alto ajuste (92,7%) y el análisis de varianza indicó que las variables independientes temperatura y PTM tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre FC. La temperatura modifica la viscosidad de la solución de alimentación, a mayores temperaturas la viscosidad decrece y aumenta FC (Barros *et al.*, 2003; Cancino-Madariaga *et al.*, 2012). La PTM tiene un efecto sobre el J porque a mayor PTM aumenta J lo que permite alcanzar mayores valores de FC (Raventós, 2005; Ruby *et al.*, 2011; Martí-Calatayud *et al.*, 2010). En la Figura 7 B se observa que la respuesta se maximiza a los máximos valores de temperatura y PTM, siendo las condiciones óptimas 31°C y 8,5 bar.

- **Balance de masa y caracterización del extracto UF obtenido bajo condiciones óptimas**

La Tabla 10 presenta el balance de masa del proceso de UF para la obtención del extracto UF bajo condiciones óptimas (31°C y 8,5 bar).

Tabla 10. Balance de masa del proceso de ultrafiltración de pulpa de tuna ultrafiltrada, utilizando membrana cerámica bajo condiciones óptimas

Parámetro	Alimentación	Permeado	Retenido	Pérdida
	(Permeado MF)			
Masa (g)	1500	920 (61%)*	460 (31%)*	8%
Betacianinas (mg EB)	140,4	28,2 (19%)*	111,7 (80%)*	1%
Betaxantinas (mg EI)	46,9	11,1 (24%)*	34,6 (74%)*	2%
Polifenoles Totales (mg EAG)	481,5	190,5 (40%)*	280,5 (58%)*	2%

EB: expresado como betanina; EI: expresado como indicaxantina; EAG: Equivalente de ácido gálico; * % respecto a la masa de alimentación.

El extracto de UF (retenido) obtenido bajo condiciones óptimas presentó un 80 y 74% de retención de betacianinas y betaxantinas, respectivamente. Resultados similares reportaron Real y Cerezal (1995) quienes obtuvieron 78,2 y 80,5% de retención de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, en un proceso de UF de jugo de betarraga utilizando membrana polimérica. Bayindirli *et al.* (1988) reportó un 59% de retención de betacianinas en UF de un extracto de betarraga, mientras que Cassano *et al.* (2007) informó un 56% de retención de betaxantinas al ultrafiltrar jugo de tuna amarilla despectinizado, utilizando membrana polimérica.

La Tabla 11 muestra las características físicas y químicas de la alimentación (permeado de MF), permeado y retenido del proceso de UF con membrana cerámica obtenidos bajo condiciones óptimas (8,5 bar y 31 °C). El contenido de betacianinas, betaxantinas y polifenoles totales en el retenido fue significativamente mayor ($p < 0,05$), respecto a la alimentación y al permeado. El FC de betacianinas obtenido en el proceso de UF bajo condiciones óptimas fue 2,8.

En el proceso de UF se obtuvo un extracto UF bajo condiciones óptimas, el cual presentó un contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) similar al de la pulpa. Sin embargo, con un contenido de sólidos solubles y azúcares totales significativamente menores ($p < 0,05$) respecto de la pulpa de tuna (Tabla 5).

Tabla 11. Características físicas y químicas de las soluciones de alimentación, permeado y retenido obtenidas por ultrafiltración con membrana cerámica bajo condiciones óptimas (8,5 bar y 31°C)

Parámetro	Alimentación (Permeado MF) (X ± DS)	Permeado (X ± DS)	Retenido (X ± DS)
Sólidos solubles (°Brix a 20°C)	6,07±0,12 c	6,5±0,06 b	8,1±0,00 a
Azúcares totales (%)	7,2±0,9 a	7,6±1,0 a	9,2±0,3 a
pH	6,7±0,09 a	5,67±0,1 b	5,56±0,1 b
Acidez (% ácido cítrico)	0,056 ±0,003 b	0,058±0,0 b	0,154±0,0 a
Densidad (g/mL)	1,017±0,04 a	1,017±0,01 a	1,024±0,0 a
Turbidez (NTU)	0,0±0,00 a	0,0±0,00 a	0,0±0,00 a
Parámetros de color			
L	30,5±0,1 b	40,1±0,0 a	17,8±0,1 c
a*	66,9±0,2 b	76,9±0,1 a	51,2±0,1 c
b*	33,2±0,3 a	12,7±0,2 c	29,9±0,1 b
C*	74,7±0,0 b	77,9±0,1 a	59,3±0,1 c
h°	26,4±0,2 b	9,4±0,1 c	30,3±0,1 a
Betacianinas (mg EB/L)	97,0±0,20 b	30,7±0,11 c	242,9±1,01 a
Betaxantinas (mg EI/L)	34,7±0,06 b	12,1±0,05 c	75,3±0,01 a
Polifenoles Totales (mg EAG/L)	245,3±4,04 b	207,3±8,33 b	659,7±25,0 a

NTU: unidad de turbidez nefelométrica; EB: expresado como betanina; EI: expresado como indicaxantina; EAG: equivalente de ácido gálico; X: promedio; DS: desviación estándar (n=3); a, b, c: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre la alimentación, permeado y retenido para cada parámetro ($p < 0,05$).

3.3.- Microencapsulación de betalaínas

Se encapsuló pulpa (P) de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) y extracto ultrafiltrado (UF) de tuna púrpura con Capsul (C) y K4484 (K) como agentes encapsulantes utilizando secado por atomización como método de encapsulación. Se estudiaron cuatro sistemas de micropartículas, pulpa - Capsul (P-C), pulpa - K4484 (P-K), extracto ultrafiltrado - Capsul (UF-C) y extracto ultrafiltrado - K4484 (UF-K).

Para lograr altas eficiencias de encapsulación (EE), recuperación (R) y rendimiento fue necesario optimizar las condiciones de secado (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La temperatura de alimentación, la temperatura del aire de entrada al secador y la temperatura de salida son variables de gran importancia en el proceso de secado (Liu *et al.*, 2004; Gharsallaoui *et al.*, 2007). La temperatura de entrada es uno de los parámetros más importantes ya que se relaciona con la velocidad de secado de la gota y con el contenido final de humedad de las micropartículas. La temperatura de salida se considera un parámetro de control porque corresponde a la temperatura final a la que se expondrán las micropartículas al término del proceso de encapsulación, sin embargo, este parámetro no puede ser controlado directamente y depende de la temperatura de entrada en las condiciones de este estudio (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Fang y Bhandari, 2010; Murugesan y Orsat, 2012). Otro factor a considerar en algunas ocasiones, es la relación activo/agente encapsulante, porque determina el contenido de sólidos del sistema. Cuando el contenido de sólidos es alto, aumenta la viscosidad y la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de la gota permitiendo la difusión del agua, pero reteniendo el agente activo (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Kenyon, 1995).

En base a estos antecedentes, en este estudio las variables independientes estudiadas correspondieron a: la relación (P ó UF)/agente encapsulante (K ó C) (variable de formulación) y la temperatura del aire de entrada al secador (variable de proceso). Las variables respuesta correspondieron a la EE de betacianinas y betaxantinas, R de betacianinas y betaxantinas, y rendimiento del proceso, de acuerdo a un diseño experimental Composito central más punto axial.

Los criterios para considerar una variable dependiente en la optimización múltiple (deseabilidad) fueron el coeficiente de determinación (R^2 -ajustado corregido por grados de libertad) (Romero y Zuñica, 2005) y los residuales. Cuando el R^2 -ajustado corregido por grados de libertad fue alto y el valor de los residuales fue menor a 6, la variable fue considerada. Para todos los casos el “lack of fit” no fue significativo.

En general, los efectos lineales se consideraron para todos los modelos, incluso cuando no fueron significativos (ej. temperatura), porque el efecto lineal es la base del experimento. Además, el mismo criterio se aplicó para el efecto interacción, ya que cuando la interacción es significativa, el efecto simple también lo es (Romero y Zuñica, 2005). Para el efecto cuadrático, la variable relación² fue significativa en todos los casos, mientras que la temperatura² no fue significativa, por lo tanto, no fue incluida en el modelo. Este comportamiento fue consistente en la mayoría de los sistemas. La variable relación (P ó UF)/agente encapsulante mostró un claro comportamiento cuadrático en todos los rangos de la experimentación, mientras que la temperatura mostró un comportamiento lineal.

Para la optimización se utilizó MSR para cada sistema de micropartículas estudiado y se empleó la función deseabilidad que permite asignar un puntaje entre 0 y 1 para un set de variables respuestas donde 1 representa la maximización de cada variable (en el caso de este estudio 1 representaría 100% de EE y R de betacianinas y betaxantinas, y de rendimiento del proceso), determinándose las condiciones óptimas para cada sistema de micropartículas estudiado.

3.3.1 Microencapsulación de pulpa de tuna

En las Tablas 12 y 13 se presentan las condiciones experimentales, la EE de betacianinas y betaxantinas, la R de betacianinas y betaxantinas y el rendimiento del proceso para los sistemas de micropartículas P-C y P-K, respectivamente.

La EE de betacianinas y betaxantinas para P-C varió en un rango entre 95,5-99,7% y 94,8-97,9%, respectivamente y para P-K entre 94,8-100% y 88,8-98,8%,

respectivamente. Los valores de EE alcanzados mostraron una alta interacción entre las betalaínas (betacianinas ó betaxantinas) con ambos agentes encapsulantes. Se ha establecido que al aumentar el contenido de sólidos en un sistema, mejora la EE (Gharsallaoui *et al.*, 2007), sin embargo, este efecto no se observó para la encapsulación de betalaínas de tuna púrpura con C ó K obteniéndose altas EE en todas las condiciones estudiadas. Similares EE para betacianinas y betaxantinas por secado por atomización se obtuvieron en la encapsulación de pulpa de tuna púrpura utilizando como agentes encapsulantes polisacáridos como maltodextrina e inulina (Sáenz *et al.*, 2009), proteínas como aislado proteico de soja y mezcla de aislado proteico de soja y polisacáridos (maltodextrina e inulina) (Torres, 2008).

La R de betacianinas y betaxantinas fluctuó para P-C entre 25,2-65,4% y 50,1-77,5%, respectivamente, y para P-K entre 33,8-71,2% y 54,7-81,2%, respectivamente. Para cada sistema se observó que la R de betaxantinas fue mayor que la de betacianinas, lo cual se atribuye a que las betaxantinas son más estables a altas temperaturas (Sáenz *et al.*, 2009). Otros estudios de encapsulación obtuvieron valores de R para betacianinas y betaxantinas de 100% en micropartículas de pulpa de tuna elaboradas con maltodextrina e inulina (Sáenz *et al.*, 2009), y de un 88,2% para betacianinas en micropartículas de jugo de betarraga con goma arábica (Pitalua *et al.*, 2010).

El rendimiento del proceso fluctuó entre 15,5-71,5% para P-C y 1,0-67,6% para P-K. Un valor intermedio (58%) obtuvo Obón *et al.* (2009) para micropartículas de jugo de tuna púrpura (*Opuntia stricta*) con jarabe de glucosa obtenidas por secado por atomización.

Tabla 12. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación de betacianinas y betaxantinas, recuperación de betacianinas y betaxantinas y rendimiento para el diseño composito central más punto axial de pulpa con Capsul (P-C)

Experimento	Relación P/C	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	EE Betac. (%)*	EE Betax. (%)*	R Betac. (%)*	R Betax. (%)*	Rendimiento (%)*
1	1:1	140	98,7 ± 1,2	96,4 ± 1,6	41,5 ± 3,8	62,3 ± 2,1	64,9 ± 2,1
2	5:1	140	99,6 ± 0,1	97,4 ± 0,3	59,1 ± 0,2	66,0 ± 3,1	71,5 ± 2,0
3	1:1	210	95,5 ± 1,3	95,4 ± 0,1	42,8 ± 1,4	64,5 ± 2,9	64,6 ± 1,8
4	5:1	210	99,5 ± 0,2	97,4 ± 0,1	60,8 ± 2,8	77,5 ± 1,9	15,5 ± 2,5
5	0,58:1	175	96,5 ± 0,3	94,8 ± 0,2	25,2 ± 1,4	50,1 ± 1,2	35,7 ± 1,9
6	5,42:1	175	99,7 ± 0,0	96,6 ± 0,3	63,4 ± 0,4	76,2 ± 0,8	60,9 ± 2,3
7	3:1	133	99,6 ± 0,3	97,9 ± 1,0	58,0 ± 1,3	75,0 ± 0,3	70,4 ± 0,9
8	3:1	217	99,1 ± 0,3	96,9 ± 0,6	65,4 ± 3,1	76,7 ± 0,9	54,4 ± 2,2
9	3:1	175	99,2 ± 0,8	97,3 ± 1,6	50,1 ± 0,6	70,0 ± 2,6	64,1 ± 2,0
10	3:1	175	99,6 ± 0,4	97,6 ± 0,9	56,7 ± 3,1	72,4 ± 0,5	61,3 ± 3,6
11	3:1	175	99,4 ± 0,1	97,9 ± 0,4	53,2 ± 0,2	75,0 ± 0,4	66,9 ± 1,6
12	3:1	175	99,4 ± 0,0	97,3 ± 0,6	57,7 ± 1,5	74,5 ± 0,2	69,7 ± 2,5

P: pulpa de tuna; C: Capsul; EE betac.: eficiencia de encapsulación de betacianinas; EE betax.: eficiencia de encapsulación de betaxantinas; R betac: recuperación de betacianinas; R betax: recuperación de betaxantinas.

Tabla 13. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación de betacianinas y betaxantinas, recuperación de betacianinas y betaxantinas y rendimiento para el diseño composito central más punto axial de pulpa con K4484 (P-K)

Experimento	Relación P/K	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	EE Betac. (%)*	EE Betax. (%)*	R Betac. (%)*	R Betax. (%)*	Rendimiento (%)*
1	1:1	120	98,1 ± 0,0	95,3 ± 1,1	46,7 ± 0,2	61,4 ± 1,5	66,1 ± 1,7
2	5:1	120	97,4 ± 1,0	93,6 ± 2,1	44,0 ± 1,3	70,4 ± 1,2	67,6 ± 1,2
3	1:1	210	95,3 ± 0,6	89,1 ± 0,7	50,2 ± 0,1	81,2 ± 0,9	58,2 ± 0,7
4	5:1	210	99,7 ± 0,5	98,8 ± 1,1	68,5 ± 0,5	79,0 ± 0,6	1,0 ± 1,3
5	0,58:1	165	95,5 ± 2,2	88,8 ± 0,1	33,8 ± 1,2	54,7 ± 1,4	21,1 ± 1,2
6	5,42:1	165	94,8 ± 0,5	94,6 ± 0,4	40,9 ± 0,9	55,0 ± 0,8	6,1 ± 2,1
7	3:1	110	100,0 ± 0,3	96,8 ± 0,1	65,1 ± 0,3	66,4 ± 0,8	50,2 ± 2,2
8	3:1	219	100,0 ± 0,0	97,0 ± 0,2	59,1 ± 1,2	80,5 ± 1,7	20,9 ± 1,5
9	3:1	165	99,5 ± 0,0	96,71 ± 0,6	67,4 ± 1,2	64,9 ± 1,8	46,0 ± 1,7
10	3:1	165	97,8 ± 0,3	98,1 ± 0,6	62,9 ± 1,4	69,8 ± 0,9	56,4 ± 1,8
11	3:1	165	98,8 ± 0,0	96,7 ± 0,5	66,0 ± 1,2	68,5 ± 1,7	56,4 ± 2,0
12	3:1	165	96,9 ± 0,3	98,1 ± 0,5	71,2 ± 1,1	72,0 ± 1,1	54,4 ± 2,3

P: pulpa de tuna; K: K4484; EE betac.: eficiencia de encapsulación de betacianinas; EE betax.: eficiencia de encapsulación de betaxantinas; R betac: recuperación de betacianinas; R betax: recuperación de betaxantinas.

El análisis de varianza indicó que las variables independientes, relación P/agente encapsulante (K ó C) y la temperatura del aire de entrada al secador, tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre todas las variables de respuesta en el proceso de secado de los sistemas P-C y P-K. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, donde se indica que la degradación del activo durante el proceso de secado ha sido asociada con reacciones de degradación inducidas por temperatura, mostrando la relevancia de la temperatura del aire de entrada al secador durante el proceso de secado (Liu *et al.*, 2004; Gharsalloui *et al.*, 2007). Además confirma que la relación activo/agente encapsulante es una variable importante, dado que un aumento en el contenido de sólidos solubles produce una rápida formación de la costra durante el proceso de secado que permite la difusión del agua pero retiene el activo, evitando su degradación (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Kenyon, 1995).

En la Figura 8 (A y B) se muestran los gráficos de Superficie Respuesta de los diseños Composito central para los sistemas de micropartículas P-C y P-K, respectivamente.

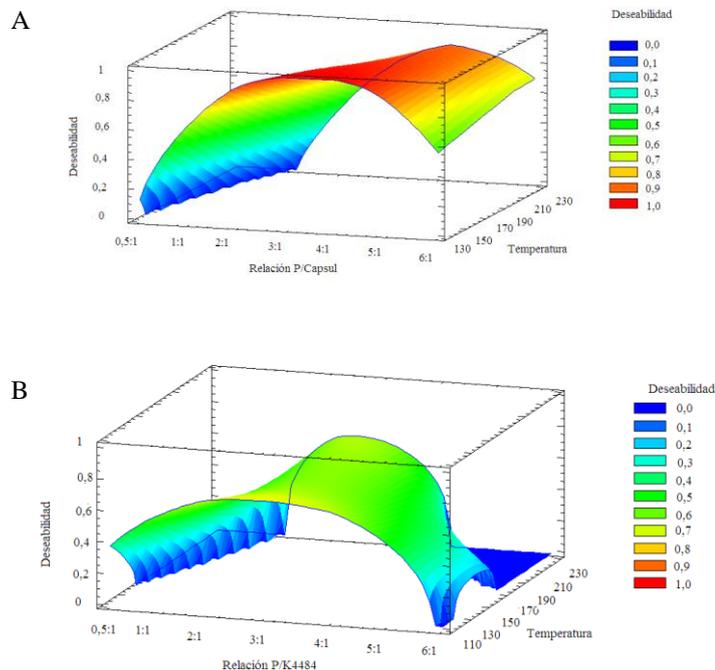


Figura 8. Gráficos de Superficie Respuesta para los sistemas de micropartículas:P-C (A) y P-K (B)

En la Figura 8 (A y B) se observa que las variables respuesta se maximizaron a valores intermedios de relación P/agente encapsulante (K ó C) y a bajas temperaturas de secado en el rango estudiado. La condición óptima para maximizar las variables respuesta correspondió a una relación P/agente encapsulante (K ó C) de 3:1 y temperatura del aire de entrada al secador de 110°C para K4484, y 133°C para Capsul. La temperatura del aire de entrada al secador dependió del tipo de agente encapsulante, mientras que la relación dependió del tipo de extracto (P). La misma relación P/agente encapsulante se obtuvo en encapsulación de pulpa de tuna de la misma especie con maltodextrina e inulina (Sáenz *et al.*, 2009).

3.3.2 Microencapsulación del extracto UF

En la Tabla 14 y 15 se presentan las condiciones experimentales, la EE de betacianinas y betaxantinas, la R de betacianinas y betaxantinas y el rendimiento del proceso para los sistemas de micropartículas UF-C y UF-K, respectivamente.

La EE de betacianinas y betaxantinas para UF-C varió en un rango entre 92,9-100% y 91,4-97,9%, respectivamente y para UF-K entre 97,5-99,8% y 96,8-99,7%, respectivamente. Los altos valores de EE (>91%) obtenidos utilizando UF como compuesto activo, corroboran que existe una alta interacción betalaínas-polímero, como se estableció para la encapsulación de pulpa de tuna.

La R de betacianinas y betaxantinas fluctuó para UF-C entre 44-67,5% y 73,1-100%, respectivamente y para UF-K entre 15,6-62,1% y 42,2-100%, respectivamente. Para cada sistema la recuperación fluctuó en un amplio rango, sin embargo, se observa que para todos los experimentos la recuperación de betaxantinas fue mayor que la de betacianinas. Igual comportamiento se observó al encapsular P. Recuperaciones de betacianinas mayores se reportó para micropartículas de extracto de betarraga elaboradas con maltodextrina (90%) (Azeredo *et al.*, 2007).

El rendimiento del proceso fluctuó entre 27,2-73,9% para UF-C y 4,7-78,9% para UF-K.

Tabla 14. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación de betacianinas y betaxantinas, recuperación de betacianinas y betaxantinas y rendimiento para el diseño composito central más punto axial de ultrafiltrado con Capsul (UF-C)

Experimento	Relación P/C	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	EE Betac. (%)*	EE Betax. (%)*	R Betac. (%)*	R Betax. (%)*	Rendimiento (%)*
1	1:1	140	95,2 ±0,1	94,2 ±0,0	52,4 ±1,6	92,9 ±0,9	73,9± 1,3
2	5:1	140	99,2 ±0,0	97,2 ±0,0	67,5 ±0,6	100,0 ± 1	47,3± 2,0
3	1:1	210	92,9 ±0,3	91,5 ±0,2	57,7 ±1,6	100,0 ±0,0	67,8± 1,7
4	5:1	210	100,0 ±0	97,0 ±0,3	44,4 ±0,7	73,1 ±0,6	27,2± 2,3
5	0,58:1	175	94,5 ±2,0	91,4 ±1,2	44,0 ±0,6	95,2 ±1,2	44,2± 2,2
6	5,42:1	175	98,5 ±0,0	97,4 ±0,1	59,9 ±1,4	93,2 ±0,0	44,6± 2,1
7	3:1	133	97,5 ±0,8	97,9 ±1,1	61,1 ±2,2	100,0 ±1,3	61,0± 1,0
8	3:1	217	97,4 ±1,4	96,8 ±1,7	58,9 ±1,5	94,1 ±2,1	65,1± 1,3
9	3:1	175	97,4 ±0,5	96,6 ±0,0	57,1 ±1,2	98,6 ±0,4	45,0± 1,5
10	3:1	175	98,0 ±0,1	96,9 ±0,0	60,1 ±1,2	91,0 ±2,0	49,0± 1,3
11	3:1	175	97,6 ±0,3	97,8 ±0,0	64,1 ±0,5	99,0 ±0,0	53,8± 2,1
12	3:1	175	98,7 ±0,1	96,9 ±0,1	57,3 ±1,2	97,0 ±0,0	48,2± 2,3

UF: extracto ultrafiltrado; C: Capsul; EE betac.: eficiencia de encapsulación de betacianinas; EE betax.: eficiencia de encapsulación de betaxantinas; R betac: recuperación de betacianinas; R betax: recuperación de betaxantinas.

Tabla 15. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación de betacianinas y betaxantinas, recuperación de betacianinas y betaxantinas y rendimiento para el diseño composito central más punto axial de ultrafiltrado con K4484 (UF-K)

Experimento	Relación P/C	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	EE Betac. (%)*	EE Betax. (%)*	R Betac. (%)*	R Betax. (%)*	Rendimiento (%)*
1	1:1	120	99,0 ± 0,0	98,8 ± 0,0	31,2 ± 1,3	73,2 ± 3,1	67,2± 1,8
2	5:1	120	98,0 ± 0,2	97,8 ± 0,3	32,5 ± 0,2	74,3 ± 0,3	58,1± 2,3
3	1:1	210	97,8 ± 0,0	96,8 ± 0,0	31,2 ± 1,7	75,4 ± 1,1	78,9± 1,1
4	5:1	210	99,8 ± 0,4	99,7 ± 0,4	50,4 ± 1,2	100,0 ± 2	4,70± 2,0
5	0,58:1	165	98,0 ± 0,0	97,9 ± 0,1	24,9 ± 0,3	75,0 ± 0,9	31,4± 1,5
6	5,42:1	165	97,7 ± 0,0	98,4 ± 0,4	62,1 ± 0,1	100,0 ± 0	29,8± 1,3
7	3:1	110	98,5 ± 0,1	96,9 ± 0,3	26,1 ± 0,9	70,9 ± 3,3	49,8± 1,0
8	3:1	219	98,7 ± 0,2	97,1 ± 0,3	21,1 ± 0,2	54,2 ± 0,1	51,4± 2,1
9	3:1	165	97,9 ± 0,4	97,3 ± 0,2	15,6 ± 0,9	42,2 ± 2,0	48,2± 2,0
10	3:1	165	98,0 ± 0,2	97,4 ± 0,9	21,1 ± 1,1	52,2 ± 1,2	57,9± 1,9
11	3:1	165	97,5 ± 0,8	97,0 ± 4,5	19,3 ± 1,4	47,2 ± 1,8	52,3± 1,8
12	3:1	165	97,9 ± 0,2	97,4 ± 0,3	25,1 ± 0,7	50,2 ± 2,3	48,2± 2,0

UF: extracto ultrafiltrado; K: K4484; EE betac.: eficiencia de encapsulación de betacianinas; EE betax.: eficiencia de encapsulación de betaxantinas; R betac: recuperación de betacianinas; R betax: recuperación de betaxantinas

El análisis de varianza indicó que la relación UF/agente encapsulante (K ó C) y la temperatura de secado tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre las variables de respuesta en el proceso de secado para los sistemas UF-C y UF-K. Estos resultados coinciden con los efectos significativos encontrados al encapsular P con ambos agentes encapsulantes, mostrando la importancia del contenido de sólidos y de la temperatura de entrada al secador para la formación de la costra sobre la superficie de la gota y la protección del activo (Gharsalloui *et al.*, 2007).

En la Figura 9 (A y B) se muestran los gráficos de Superficie Respuesta de los diseños Composito central para los sistemas de micropartículas UF-C y UF-K, respectivamente. Se observa que para el sistema UF-C las variables respuesta se maximizaron a valores intermedios de relación y a bajas temperaturas de secado en el rango estudiado, mientras que para el sistema UF-K (Figura 9 B) la optimización se alcanzó a bajos valores de relación y temperatura de secado. Las condiciones óptimas de relación y temperatura correspondieron a 2,5:1 a 133°C para UF-C y 1:1 a 110°C para UF-K.

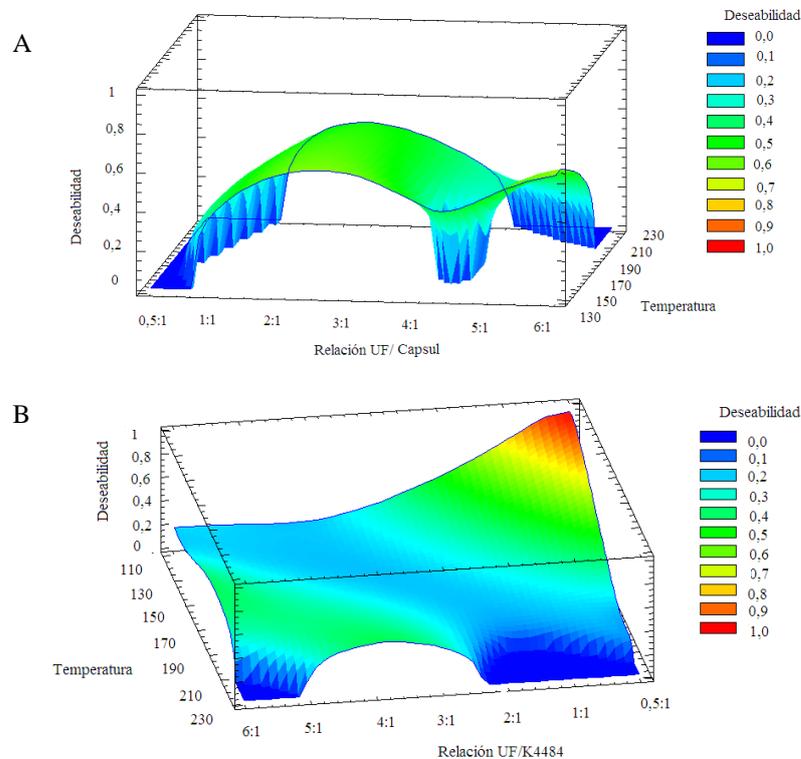


Figura 9. Gráficos de Superficie Respuesta para los sistemas de micropartículas: UF-C(A) y UF-K(B)

3.3.3 Caracterización de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas

La Tabla 16 muestra las condiciones óptimas, EE y R de betacianinas y betaxantinas y rendimiento para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K.

Tabla 16. Condiciones óptimas, eficiencia de encapsulación y recuperación de betacianinas y betaxantinas, y rendimiento del proceso para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidos bajo condiciones óptimas

Sistema	P-C/óptimo (X ± DS)	P-K/óptimo (X ± DS)	UF-C/óptimo (X ± DS)	UF-K/óptimo (X ± DS)
Relación (P ó UF)/agente encapsulante (K ó C)	3:1	3:1	2,5:1	1:1
Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	133	110	133	110
EE Betacianinas (%)	99,3 ± 0,6 a	99,6 ± 0,4 a	99,1 ± 0,4 a	99,6 ± 0,4 a
EE Betaxantinas (%)	98,6 ± 0,6 a	98,5 ± 1,3 a	98,7 ± 0,6 a	99,3 ± 0,6 a
R Betacianinas (%)	70,9 ± 1,9 b	68,5 ± 1,0 b	72,4 ± 2,4 b	77,8 ± 2,4 a
R Betaxantinas (%)	88,5 ± 2,0 b	79,2 ± 1,2 b	96,8 ± 2,9 a	100 ± 0,0 a
Rendimiento (%)	65,3 ± 5,1 a	69,4 ± 0,2 a	62,6 ± 6,8 a	65,7 ± 1,8 a

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; AE: agente encapsulante; K: K4484; C: Capsul; P-C: sistema pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema pulpa de tuna con K4484; UF-C: sistema UF con Capsul; UF-K: sistema UF con K4484; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); letras diferentes indican diferencias significativas entre sistemas para cada parámetro (p<0,05).

La condición óptima de relación P/agente encapsulante fue 3:1 independiente del agente encapsulante Capsul o K4484. Este mismo efecto observó Sáenz *et al.* (2009) en micropartículas de pulpa de tuna púrpura con maltodextrina e inulina como agentes encapsulantes. En los sistemas con UF la relación óptima UF/ agente encapsulante fue 2,5:1 y 1:1 al utilizar Capsul y K4484, respectivamente, sugiriendo que la relación UF/agente encapsulante dependió del tipo de agente encapsulante. Las diferencias en la relación (P ó UF)/ agente encapsulante se atribuyen a la presencia de mucílago en la pulpa, al cual se le han descrito propiedades encapsulantes (Medina-Torres *et al.*, 2013), siendo posible incorporar una menor cantidad de agente encapsulante en P-C y P-K.

Como ya se indicó, la condición óptima de temperatura del aire de entrada al secador para los sistemas de micropartículas con Capsul (P-C y UF-C) y K4484 (P-K y UF-K) fue 133 y 110°C, respectivamente. Los resultados muestran que la temperatura de

secado dependió del tipo y naturaleza del agente encapsulante y no del tipo de extracto o fuente de betalaínas.

La EE de betacianinas y betaxantinas alcanzó valores sobre 98% para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidos bajo condiciones óptimas, sin existir diferencias significativas entre ellos. Estos resultados se atribuyen a la fuerte interacción betalaínas-polímero dada por la naturaleza catiónica que poseen las betalaínas. En su estructura tienen un nitrógeno cargado positivamente (Kanner *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2008) y los polímeros presentan carga negativa (Cai y Corke, 2000), sugiriendo que entre ellos existen interacciones electrostáticas y/o formación de puentes de hidrógeno.

La R de betacianinas y betaxantinas en los sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas varió en un rango de 68,5-77,8% y 79,2-100%, respectivamente. La recuperación de betacianinas para el sistema UF-K fue significativamente mayor ($p < 0,05$) respecto a P-C, P-K y UF-C. lo cual se atribuye al mayor contenido de sólidos (32,4 g para UF-K *versus* 14,2 g para P-C, P-K y UF-C). Así, un mayor contenido de sólidos formaría rápidamente una 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).

Respecto del rendimiento no se observaron diferencias significativas entre los sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas y los valores obtenidos fluctuaron entre 62,6 y 69,4%.

En la Tabla 17, se presentan las características físicas y químicas de los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidas bajo condiciones óptimas.

Tabla 17. Características físicas y químicas de los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidas bajo condiciones óptimas

Parámetro	P-C (X ± DS)	P-K (X ± DS)	UF-C (X ± DS)	UF-K (X ± DS)
Humedad (%)	3,7 ± 0,3 b	2,8 ± 0,04 c	5,1 ± 0,04 a	2,9 ± 0,19 c
Actividad de agua (a _w)	0,23 ± 0,01b	0,22 ± 0,01b	0,30±0,003a	0,30±0,003a
Betacianinas (mg EB/ g)	0,36 ± 0,03 a	0,34 ± 0,01 a	0,36 ± 0,01a	0,34 ± 0,01 a
Betaxantinas (mg EI/ g)	0,16 ± 0,04 a	0,15 ± 0,06 a	0,16 ± 0,01 a	0,15 ± 0,05 a
Polifenoles Totales (mg EAG/g)	1,0 ± 0,04 a	0,9 ± 0,09 a	0,9 ± 0,02a	0,9 ± 0,06 a
Higroscopicidad (g/100g)	49,7±2,41ab	54,8±3,58a	40,4±0,30c	48,1±3,54b
Tamaño de partícula D(3,2) (µm)	4,7	4,5	4,6	4,4
Parámetros de Color				
L	69,3 ± 0,1 b	66,0 ± 0,21 c	69,2 ± 0,06 b	71,8 ± 0,12 a
a*	23,6 ± 0,1 b	26,4 ± 0,15 a	23,7 ± 0,20 b	21,0 ± 0,10 c
b*	-6,6 ± 0,00 c	-6,9 ± 0,00 d	-6,2 ± 0,00 b	-4,7± 0,06 a
C*	24,5 ± 0,1 b	27,3 ± 0,15 a	24,5 ± 0,19 b	21,5 ± 0,11 c
h°	344,4 ± 0,1 c	345,3 ± 0,08 b	345,3 ± 0,1 b	347,2 ± 0,1 a

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; P-C: sistema pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema pulpa de tuna con K4484; UF-C: sistema UF con Capsul; UF-K: sistema UF con K4484; EB:expresado como equivalente a betanina; EI: expresado como equivalente a indicaxantina; EAG: equivalente de ácido gálico; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre sistemas para cada parámetro (p < 0,05).

El contenido de humedad varió entre 2,8 y 5,1%, valores comúnmente alcanzados en partículas obtenidas mediante secado por atomización (Cai y Corke, 2000, Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005; Gharsalloui *et al.*, 2007; Sáenz *et al.*, 2009; Obón *et al.*, 2009). Se observa que no existen diferencias significativas en el contenido de betacianinas, betaxantinas y polifenoles totales para los sistemas de micropartículas obtenidos bajo condiciones óptimas.

El tamaño de las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidos bajo condiciones óptimas presentó una distribución unimodal (un solo rango de tamaño). De acuerdo al valor D(3,2) los sistemas de micropartículas presentaron un tamaño de partícula entre 4,4 y 4,7 µm, dentro del rango establecido para micropartículas obtenidas mediante secado por atomización (Gharsalloui *et al.*, 2007). Obón *et al.* (2009) y Cai y Corke (2000) reportaron valores similares para

micropartículas de jugo de *Opuntia stricta* y micropartículas de extracto de amaranto, respectivamente.

Los parámetros de color fueron similares a los reportados por Sáenz *et al.* (2009) en micropartículas de pulpa de tuna (*Opuntia ficus-indica*) y por Obón *et al.* (2009) en polvos colorantes de pulpa de tuna (*Opuntia stricta*). De acuerdo al diagrama de color, los valores de los parámetros medidos para cada sistema corresponden a una coloración púrpura.

La Figura 10 (A, B, C y D) muestra las microfotografías SEM de los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K, respectivamente obtenidas bajo condiciones óptimas.

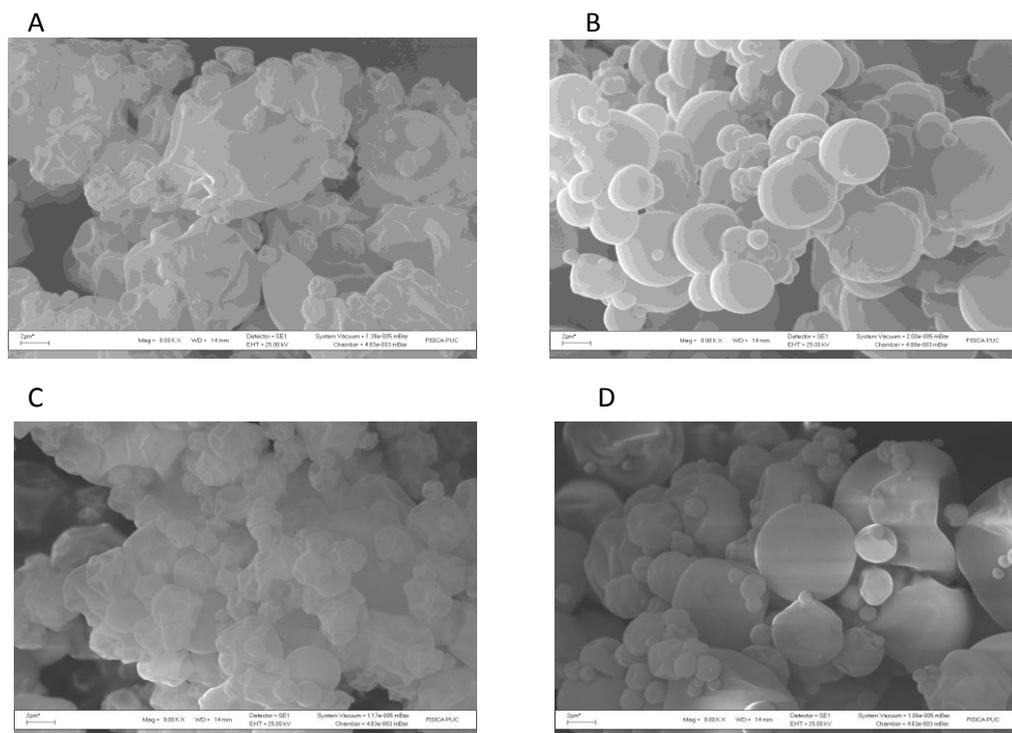


Figura 10. Microfotografías de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas P-C (A), P-K (B), UF-C (C) y UF-K (D) (Mag 8.00 KX)

Las micropartículas de los sistemas P-C y UF-C presentaron forma esférica, con superficie rugosa, con numerosas indentaciones y tendencia a aglomerarse. Las micropartículas de los sistemas P-K y UF-K fueron esféricas, con superficie lisa, pocas indentaciones y aglomeración. La formación de indentaciones ha sido atribuida

al encogimiento de las partículas durante el proceso de secado y se puede producir a bajas o altas temperaturas de entrada al secador (Alamilla-Beltran *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.

Una morfología similar se observó para micropartículas de jugo de tuna (*Opuntia lasiachanta*) (Díaz *et al.*, 2006) y pulpa de tuna (*Opuntia ficus-indica*) (Sáenz *et al.*, 2009) obtenidas por secado por atomización utilizando maltodextrina e inulina.

3.4.- Cinética de degradación de betacianinas y betaxantinas

Se estudió la estabilidad de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K durante el almacenamiento a 30, 45 y 60°C.

La Figura 11 (A, B, C y D) muestra el logaritmo natural del porcentaje de retención de betacianinas *versus* tiempo (días) para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K, respectivamente, obtenidos bajo condiciones óptimas y almacenadas a 30, 45 y 60° C. Los datos de la retención de betacianinas en el tiempo se muestran en el Anexo 9.

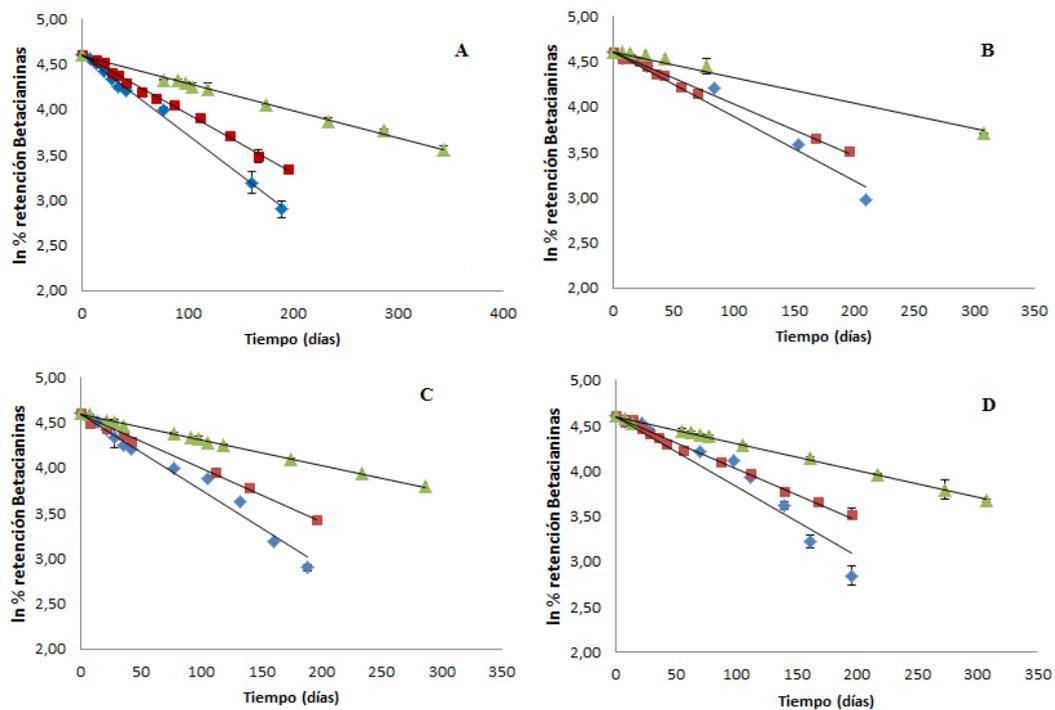


Figura 11. Cinética de degradación de betacianinas para los sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas: P-C(A), P-K (B), UF-C (C) y UF-K (D), almacenadas a 30°C (▲), 45°C (■) y 60°C (◆)

La Figura 12 (A, B, C y D) muestra el logaritmo natural del porcentaje de retención de betaxantinas *versus* tiempo (días) para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K, respectivamente, obtenidos bajo condiciones óptimas y almacenadas a 30, 45 y 60° C. Los datos de la retención de betaxantinas en el tiempo se muestran en el Anexo 10.

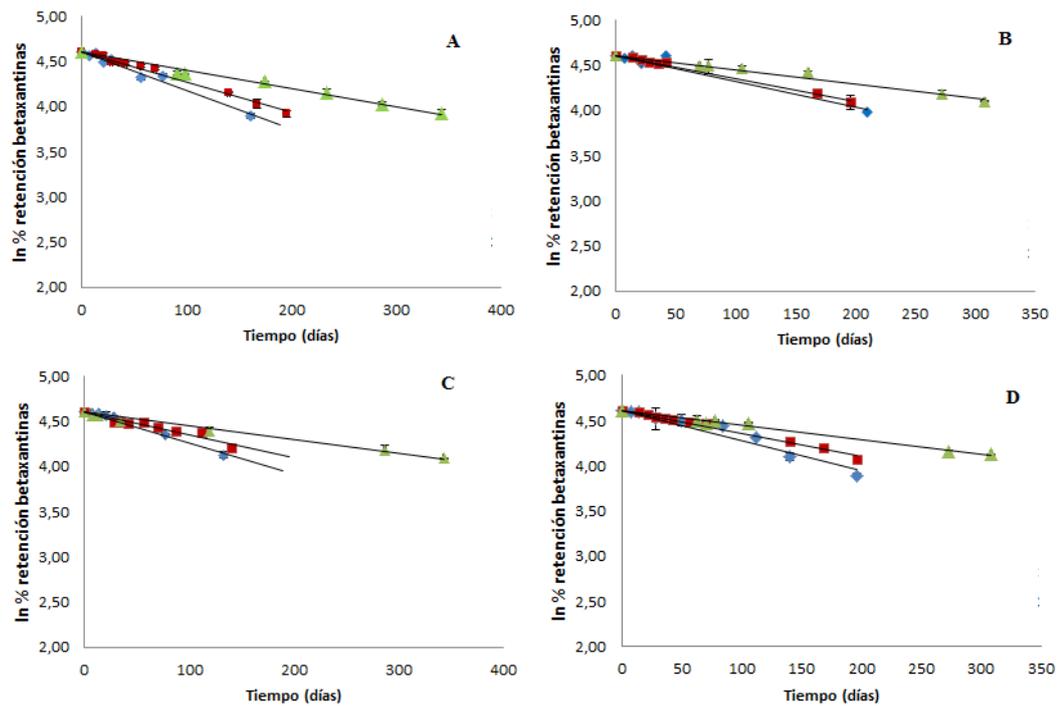


Figura 12. Cinética de degradación de betaxantinas para los sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas: P-C(A), P-K (B), UF-C (C) y UF-K (D), almacenadas a 30°C (▲), 45°C (■) y 60°C (◆).

El coeficiente de correlación (R^2) se utilizó como parámetro para determinar el orden de las cinéticas de betacianinas y betaxantinas para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K. La degradación de betacianinas y betaxantinas siguió una cinética de pseudo-primero orden en los sistemas de micropartículas a las tres temperaturas estudiadas (Figura 11 y 12). El mismo orden de reacción se observó en estudios de estabilidad de betacianinas en micropartículas de pulpa y extracto hidroalcohólico de tuna púrpura con maltodextrina e inulina, almacenadas a 60°C (Sáenz *et al.*, 2009), para micropartículas de extracto de betarraga con pululano y maltodextrina de diferentes equivalentes de dextrosa (5 y 20 ED), almacenadas a 30, 40 y 50°C (Serris y Biliaderis, 2001) y en micropartículas de extracto de amaranto con maltodextrinas de diferentes ED almacenadas a 25°C (Cai y Corke, 2000).

En el caso de jugos que contienen betacianinas y betaxantinas también se han reportado cinéticas de degradación de primer orden como en: jugo de betarraga almacenado entre 60 y 100°C a diferentes condiciones de pH (Saguy *et al.*, 1978), colorante de betarraga reconstituido almacenado a 60, 70 y 80°C a diferentes

condiciones de pH (Pátkai y Barta, 1996), jugo de betarraga sin tratamiento térmico y expuesto a 85°C entre 1 y 5 horas (Herbach *et al.*, 2004), pulpa de garambullo a pH 5,5 y almacenadas entre 0 y 100°C (Reynoso *et al.*, 1997), jugo de tuna amarilla almacenados a 50, 70 y 90°C y jugo de frutos de *Opuntia Stricta* almacenados a 50 y 90°C a pH 5 (Castellar *et al.*, 2003). Estos resultados muestran que tanto en jugos como en micropartículas la degradación de betacianinas y betaxantinas siguen el mismo orden de degradación.

En la Figura 13 (A y B) se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC de betacianinas en el sistema de micropartículas UF-C a 535 nm, antes y después del almacenamiento a 60°C durante 161 días.

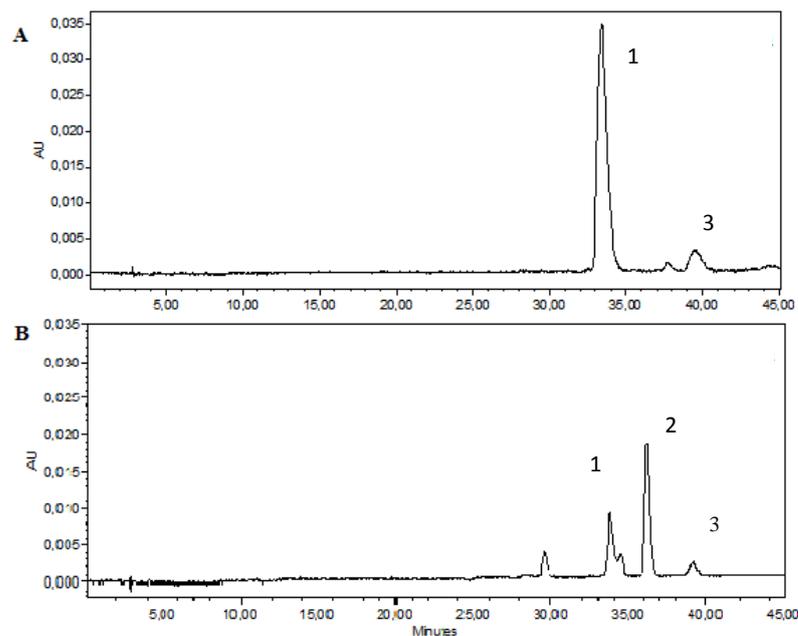


Figura 13. Cromatogramas obtenidos por HPLC de betacianinas en micropartículas del sistema UF-C a 535 nm antes (A) y después (B) del almacenamiento a 60°C durante 160 días. Betanina (1), compuesto desconocido (X) (2), isobetanina (3)

Los cromatogramas monitoreados a 535 nm muestran que betanina (peak 1) decrece en el tiempo y que emerge un nuevo peak (2), compuesto desconocido. No se observó un aumento en el peak (3) de isobetanina durante el almacenamiento a las tres temperaturas mostrando que no hubo reacción de isomerización, lo cual se puede

atribuir a que las temperaturas de almacenamiento son bajas. Un comportamiento similar se observó para los sistemas de micropartículas P-C, P-K y UF-K

La Figura 14 muestra el equilibrio de betanina en el sistema de micropartículas UF-C, almacenadas a 60°C durante 161 días. En la Figura 14, se observa un descenso en el área del peak de betanina y una acumulación y posterior disminución de un nuevo compuesto (desconocido) y del ciclo dopa y el ácido betalámico durante el almacenamiento.

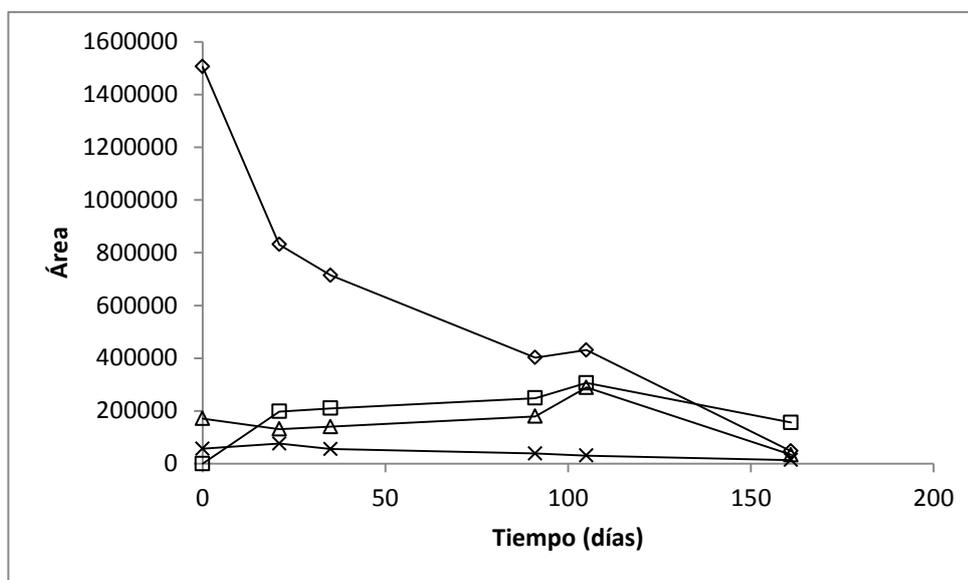


Figura 14. Equilibrio de betanina en el sistema de micropartículas UF-C, durante el almacenamiento a 60°C por 161 días; ◇ betanina, □ compuesto desconocido, △ ciclo dopa y × ácido betalámico.

La degradación de betacianinas desde micropartículas puede ocurrir principalmente por un camino de hidrólisis (Herbach *et al.*, 2006), produciéndose una ruptura del enlace aldimina de la betanina formando ácido betalámico y ciclo dopa (reacción reversible), los cuales se observaron en el cromatograma por HPLC a 410 y 280 nm, respectivamente. Por otro lado también hay una reacción reversible que forma un producto desconocido (Figura 14). De acuerdo a estos antecedentes se sugiere el esquema que se presenta en la Figura 15

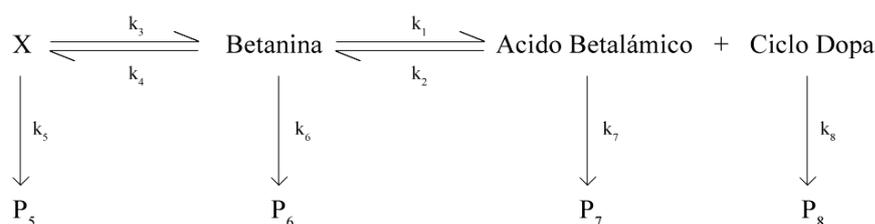


Figura 15. Esquema equilibrio de betanina en el sistema de micropartículas UF-C durante el almacenamiento a 60°C (X: compuesto desconocido)

La Tabla 18 muestra las constantes de velocidad de degradación de betacianinas y betaxantinas (k_{obs}) para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas a 30, 45 y 60°C.

Tabla 18. Constantes de velocidad de degradación de betacianinas y betaxantinas (k_{obs}) para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas a 30, 45 y 60°C

Sistemas	30°C		45°C		60°C	
	$10^3 k_{\text{(obs)}} \pm 10^2 \text{DS (días}^{-1}\text{)}$	R^2	$10^3 k_{\text{(obs)}} \pm 10^2 \text{DS (días}^{-1}\text{)}$	R^2	$10^3 k_{\text{(obs)}} \pm 10^2 \text{DS (días}^{-1}\text{)}$	R^2
Betacianinas						
P-C	3,1 ± 0,01 a	0,98	6,5 ± 0,01 a	0,99	8,2 ± 0,03 a	0,98
P-K	2,8 ± 0,01 a	0,98	5,7 ± 0,01 b	0,99	7,1 ± 0,01 b	0,95
UF-C	3,0 ± 0,01 a	0,99	5,8 ± 0,01 b	0,99	7,2 ± 0,02 b	0,99
UF-K	3,0 ± 0,01 a	0,99	5,7 ± 0,01 b	0,99	7,4 ± 0,07 b	0,93
Betaxantinas						
P-C	2,0 ± 0,00 a	0,97	3,3 ± 0,00 a	0,99	4,3 ± 0,02 a	0,95
P-K	1,5 ± 0,01 b	0,96	2,4 ± 0,01 b	0,99	3,0 ± 0,00 b	0,93
UF-C	1,6 ± 0,01 b	0,99	2,5 ± 0,01 b	0,92	3,3 ± 0,00 b	0,97
UF-K	1,6 ± 0,01 b	0,98	2,5 ± 0,01 b	0,98	3,3 ± 0,00 b	0,94

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; P-C: sistema pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema pulpa de tuna con K4484; UF-C: sistema ultrafiltrado con Capsul; UF-K: sistema ultrafiltrado con K4484; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); letras distintas entre filas indican diferencias estadísticamente significativas entre sistemas para betacianinas y betaxantinas ($p < 0,05$).

En la Tabla 18 se observa que un aumento de la temperatura de almacenamiento provocó un aumento de las constantes de velocidad de degradación de betacianinas y betaxantinas en los sistemas de micropartículas estudiados. El mismo efecto fue observado por Serris y Biliaderis (2001) en la estabilidad de betacianinas en

micropartículas de extracto de betarraga. Además, las constantes de velocidad de degradación de las betaxantinas fueron menores que las de betacianinas a todas las temperaturas estudiadas.

Las constantes de velocidad de degradación de betacianinas y betaxantinas obtenidas en este estudio fueron menores a las informadas para betacianinas en micropartículas de pulpa de tuna elaboradas con inulina ($1,07 \times 10^{-2}$ días⁻¹) y maltodextrina ($1,06 \times 10^{-2}$ días⁻¹) a 60°C (Sáenz *et al.*, 2009). Sin embargo, fueron mayores respecto a las constantes de velocidad de betacianinas informadas en micropartículas de extracto de betarraga elaboradas con pululano ($1,81 \times 10^{-3}$ días⁻¹), maltodextrina (5 ED) ($0,41 \times 10^{-3}$ días⁻¹) y maltodextrina (20 ED) ($0,41 \times 10^{-3}$ días⁻¹) a 30°C (Serris y Biliaderis, 2001). En otros sistemas como jugos, encontró constantes de velocidad de degradación de betacianinas significativamente mayores a las de este estudio. En jugo de betarraga a pH 7 a 25°C ($0,61 \times 10^{-3}$ min⁻¹) (von Elbe *et al.*, 1974), a 61,5°C ($4,5 \times 10^{-3}$ min⁻¹) (Saguy, 1979) y en pulpa de tuna a 50°C ($3,8 \times 10^{-3}$ min⁻¹) (Merin *et al.*, 1987). Por lo tanto, se observa que las constantes de velocidad de degradación de las betalaínas son significativamente mayores en solución respecto a los sistemas de micropartículas, sugiriendo que la microencapsulación otorga efectivamente una protección a los pigmentos frente a las condiciones del medio, aumentando su estabilidad.

El sistema P-C presentó constantes de velocidad de degradación de betacianinas y betaxantinas significativamente mayores respecto a los sistemas de micropartículas P-K, UF-C y UF-K. Un efecto del tipo de extracto sobre la k_{obs} de betacianinas se observó al comparar P-C y UF-C. La menor estabilidad de betacianinas en P-C se puede atribuir al mayor contenido de mucílago de la pulpa, que aumentaría la higroscopicidad de las micropartículas (Sáenz *et al.*, 2004; Matsuhiro *et al.*, 2006) favoreciendo reacciones de hidrólisis.

En otros estudios de encapsulación se ha observado que el contenido de azúcares tiene un efecto sobre la permeabilidad al oxígeno en las micropartículas favoreciendo la oxidación de los compuestos bioactivos (Robert *et al.*, 2003). Sin embargo, dicho

efecto no se observó en este estudio porque la degradación ocurre principalmente por un mecanismo hidrólisis.

La Tabla 19 presenta los Parámetros de Arrhenius y termodinámicos de betacianinas y betaxantinas para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas a 30, 45 y 60°C.

Los Parámetros de Arrhenius (energía de activación) y termodinámicos (entalpía de activación y entropía de activación) de betacianinas y betaxantinas no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K. Estos resultados muestran que no hay un efecto del tipo de extracto y tipo de agente encapsulante sobre la energía de activación, entalpía y entropía de activación. Valores mayores de energía de activación fueron reportados para micropartículas de extracto de betarraga con pululano (83,65 KJ/mol), con maltodextrina (5 ED) (66,8 KJ/mol) y maltodextrina (20 ED) (41,8 KJ/mol) (Serris y Biliaderis, 2001). La vida media ($t_{1/2}$) a 25°C de betacianinas y betaxantinas fluctuó entre 241-262 y 372-573 días, respectivamente, para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K. Cai y Corke (2000) obtuvieron valores de vida media de 305, 344 y 445 días para micropartículas de extracto de amaranto con maltodextrina de 10 ED, 25 ED y 25 ED/10 ED, respectivamente.

Tabla 19. Parámetros de Arrhenius y termodinámicos de betacianinas y betaxantinas para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K obtenidas bajo condiciones óptimas

Sistemas	Energía activación (KJ/mol)	Intercepto (ln A)	R ²	Vida media calculada a 25°C (días)	Entalpía de activación (KJ/mol)	Entropía de activación (J/mol K)	R ²
Betacianinas							
P-C	27,3 ± 1,2 a	5,2 ± 0,5 a	0,96	241	24,7 ± 1,2 a	-184,2 ± 3,9 a	0,95
P-K	26,1 ± 0,2 a	4,6 ± 0,1 a	0,94	262	23,5 ± 0,2 a	-179,2 ± 0,7 a	0,92
UF-C	24,9 ± 0,9 a	4,2 ± 0,4 a	0,92	250	22,4 ± 1,0 a	-175,9 ± 3,2 a	0,90
UF-K	25,0 ± 2,4 a	4,2 ± 0,9 a	0,92	252	22,4 ± 2,4 a	-176,1 ± 7,8 a	0,92
Betaxantinas							
P-C	21,2 ± 1,3 a	2,3 ± 0,5 a	0,99	372	18,6 ± 1,3 a	-160,1 ± 4,3 a	0,99
P-K	20,1 ± 1,1 a	1,5 ± 0,4 a	0,91	526	17,5 ± 1,1 a	-153,8 ± 0,7 a	0,92
UF-C	20,5 ± 3,2 a	1,7 ± 1,3 a	0,98	573	17,9 ± 3,3 a	-155,7 ± 10 a	0,98
UF-K	20,6 ± 2,1 a	1,8 ± 0,8 a	0,99	475	18,0 ± 2,4 a	-155,9 ± 6,6 a	0,99

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; P-C: sistema pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema pulpa de tuna con K4484; UF-C: sistema UF con Capsul; UF-K: sistema UF con K4484; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); letras distintas entre filas indican diferencias estadísticamente significativas entre sistemas para betacianinas y betaxantinas (p < 0,05).

Además, se observó que a mayores valores de entalpía disminuye la entropía de activación, la existencia de dicha inversión supone un punto isocinético que podría conducir matemáticamente a una relación lineal entre la entalpía y la entropía de activación como un efecto de compensación (Rudra *et al.*, 2008).

En la Figura 16 se muestra la línea isocinética de degradación de betacianinas y betaxantinas de los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K.

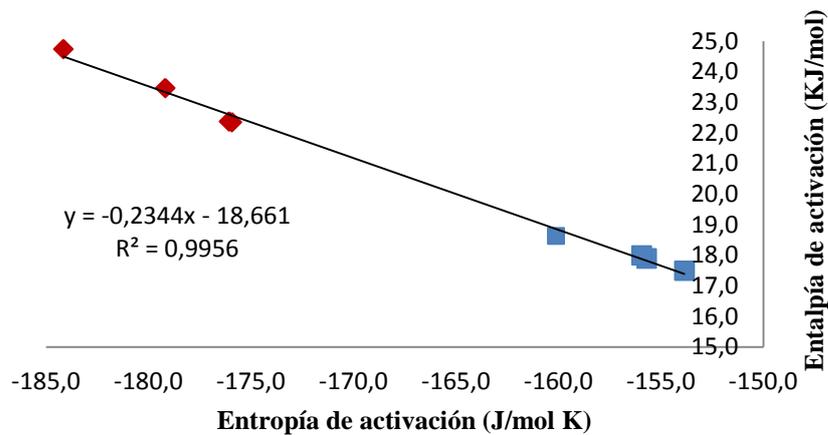


Figura 16. Línea isocinética de degradación de betacianinas y betaxantinas desde los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K; ♦ betacianinas y ■ betaxantinas

Se obtuvo una relación lineal ($R^2 = 0,9956$) entre la entalpía de activación y la entropía de activación de los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K, lo cual sugiere que las betacianinas y betaxantinas se degradan por mecanismos similares en todos los sistemas estudiados.

En consecuencia, en numerosos estudios de encapsulación de compuestos bioactivos se ha descrito un mecanismo de degradación por oxidación. Sin embargo, en este estudio se observó que la degradación de las betalainas en las micropartículas ocurrió principalmente por un mecanismo de hidrólisis, siendo la higroscopicidad de éstas un factor determinante en su estabilidad en almacenamiento. En ambos mecanismos, el tipo y naturaleza del agente encapsulante, y el contenido de azúcares simples y mucílago de los extractos serán importantes e influirán en la permeabilidad al oxígeno (mecanismo de oxidación) o en la higroscopicidad (mecanismo de hidrólisis).

3.5 Adición de las micropartículas a mezclas secas

3.5.1 Caracterización de las mezclas secas

La Tabla 20 muestra el contenido de betacianinas y betaxantinas y los porcentajes de solubilidad de las mezclas secas formuladas con los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K.

Tabla 20. Contenido de betacianinas y betaxantinas y solubilidad de mezclas secas formuladas con los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K

Parámetro	Mezcla seca /	Mezcla seca /	Mezcla seca /	Mezcla seca /
	P-C (X ± DS)	P-K (X ± DS)	UF-C (X ± DS)	UF-K (X ± DS)
Betacianinas (mg EB/ g)	0,027 ± 0,06 a	0,032 ± 0,04 a	0,029 ± 0,05 a	0,028 ± 0,04 a
Betaxantinas (mg EI/g)	0,012 ± 0,03a	0,014 ± 0,02 a	0,013 ± 0,02 a	0,013 ± 0,01a
pH	2,79 ± 0,01 a	2,89 ± 0,01 a	2,80 ± 0,01 a	2,82 ± 0,00 a
Solubilidad (%)	99,4 ± 0,05 a	99,4 ± 0,1 a	99,6 ± 0,06 a	99,5 ± 0,2 a

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; P-C: sistema Pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema Pulpa de tuna con K4484; UF-C: sistema UF con Capsul; UF-K: sistema UF con K4484; EB: expresado como equivalente a betanina; EI: expresado como equivalente a indicaxantina; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); Letras iguales entre columnas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre sistemas para cada parámetro.

El contenido de betacianinas y betaxantinas no presentó diferencias significativas entre los sistemas de mezclas secas. Las mezclas secas presentaron altos valores de solubilidad en agua, sobre un 99% para todos los sistemas estudiados, sin presentar diferencias significativas entre sistemas. Estos resultados están en línea con la solubilidad de los agentes encapsulantes (Capsul y K-4484) y la naturaleza hidrofílica de las betalaínas. Resultados similares de solubilidad, se encontró para micropartículas de pulpa de mango (92%) con otros agentes encapsulantes (maltodextrina, goma arábica y almidón ceroso), obtenidas por secado por atomización (Cano-Chauca *et al.*, 2005). Una alta solubilidad de las mezclas secas formuladas con micropartículas de pulpa y extracto UF permitiría su aplicabilidad en productos instantáneos y/o bebidas refrescantes.

3.5.2 Estabilidad de betacianinas y betaxantinas en las mezclas secas durante el almacenamiento a 30°C

En la Figura 17 (A y B) se presenta el gráfico de retención de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, frente al tiempo de almacenamiento a 30°C de las mezclas secas elaboradas con los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K.

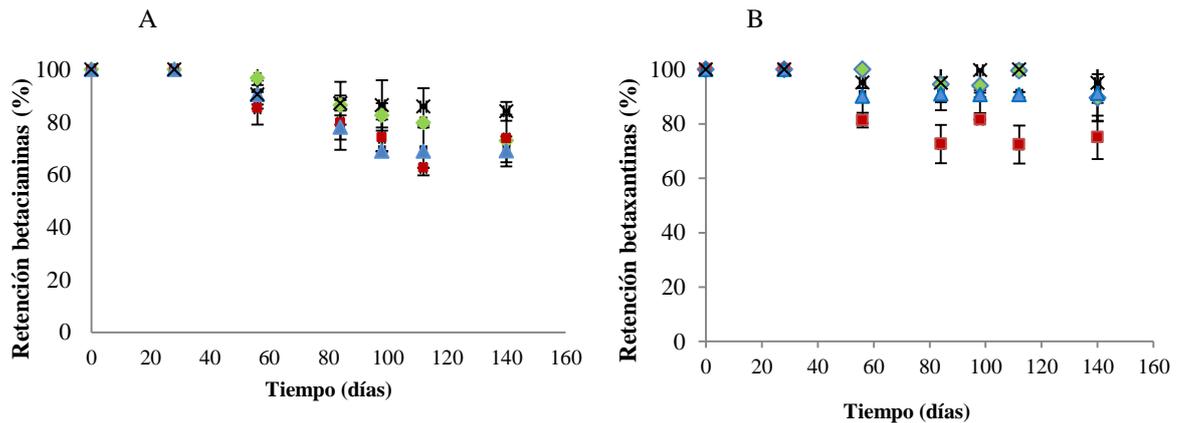


Figura 17. Retención de betacianinas (A) y betaxantinas (B) en el tiempo a 30°C, en mezclas secas formuladas con los sistemas de micropartículas P-C (◆), P-K (▲), UF-C (■) y UF-K (×)

En todos los sistemas la retención de betacianinas y betaxantinas disminuyó significativamente con el tiempo de almacenamiento a 30°C, siendo la retención de betaxantinas mayor que la de betacianinas.

La Tabla 21 muestra la retención de betacianinas y betaxantinas en las mezclas secas formuladas con los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K durante el almacenamiento a 30°C.

Tabla 21. Retención de betacianinas y betaxantinas en las mezclas secas formuladas con los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K durante el almacenamiento a 30°C

Sistemas	Mezcla seca / P-C (X ± DS)	Mezcla seca / P-K (X ± DS)	Mezcla seca / UF-C (X ± DS)	Mezcla seca / UF-K (X ± DS)
Betacianinas				
0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
140	73,0 ± 9,8 b	73,8 ± 0,8b	69,0 ± 4,3 b	84,1 ± 3,6 a
Betaxantinas				
0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,00	100 ± 0,00
140	89,6 ± 8,7 a	75,1 ± 10,4 b	91,2 ± 13,3 a	95,1 ± 7,3 a

P: pulpa de tuna; UF: extracto ultrafiltrado; P-C: sistema pulpa de tuna con Capsul; P-K: sistema pulpa de tuna con K4484; UF-C: sistema UF con Capsul; UF-K: sistema UF con K4484; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre sistemas para cada parámetro (p < 0,05).

En la Tabla 21 se observa que la retención de betacianinas y betaxantinas alcanzó valores sobre un 69 y 75%, respectivamente a los 140 días de almacenamiento. Estos resultados mostraron que la estabilidad de betalaínas en la mezcla seca fue levemente mayor que en las micropartículas a la misma temperatura de almacenamiento para todos los sistemas de micropartículas estudiados, lo cual se podría atribuir a que los otros componentes de la mezcla seca como los azúcares podrían actuar como un material de recubrimiento físico sobre las micropartículas.

A los 140 días de almacenamiento, se encontró que la mezcla seca formulada con el sistema de micropartículas UF-K tuvo una retención de betacianinas y betaxantinas significativamente mayor con respecto a las mezclas secas formuladas con micropartículas de los sistemas P-C, P-K y UF-K.

CONCLUSIONES

1. Aplicando la tecnología de membranas (MF y UF) se obtuvo un extracto clarificado (libre de mucílago) con menor contenido de azúcares, pero con el mismo contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) en relación a la pulpa de tuna.
2. En la microencapsulación, la temperatura de secado y la relación (P ó UF)/encapsulante tuvieron un efecto significativo sobre la EE y recuperación de betacianinas y betaxantinas y rendimiento. Los altos valores de EE (sobre 98%) reflejan una alta interacción polímero-betalaínas en todos los sistemas de micropartículas estudiados, independientemente del tipo de extracto y naturaleza del agente encapsulante.
3. La presencia de mucílago en la pulpa de tuna ejerció un efecto en la formulación de las micropartículas sugiriendo que actúa como agente encapsulante, siendo posible utilizar menos polímero. Sin embargo, el mucílago no ejerció un efecto sobre la EE, recuperación de betalaínas, rendimiento y parámetros termodinámicos, respecto al extracto UF (sin mucílago).
4. La estabilidad de betacianinas y betaxantinas en todos los sistemas de micropartículas estudiados fue alta, en acuerdo con las bajas constantes de velocidad de degradación y altas vidas medias. De acuerdo a la línea isocinética todos los sistemas de micropartículas siguieron un mismo mecanismo de degradación de betalaínas, siendo la hidrólisis el principal.
5. Las micropartículas obtenidas en este estudio podrían ser aplicadas como colorantes con actividad antioxidante en la industria de alimentos para el diseño de productos instantáneos como jugos, sopas entre otros, debido a su alta estabilidad y solubilidad.

BIBLIOGRAFIA

- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J.J., Jiménez-Aparicio, A.R. y Gutiérrez-López, G.F. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* **67**, 179-184.
- Allegra, M., Furtmuller, P., Jantschko, W., Zederbauer, M., Tesoriere, L., Livrea, M. y Obinger, C. 2005. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **332**, 837–844.
- Amin, K.A., Abdel Hameid, H. y Abd Elsttar, A.H. 2010. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 2994–2999.
- AOAC. 1996. Official methods of analysis of AOAC International (16th ed.). Gaythersburg, USA.
- Attoe, E.L. y von Elbe, J.H. 1981. Photochemical degradation of betanin and selected anthocyanins. *Journal of Food Science* **46**, 1934–1937.
- Attoe, E.L. y von Elbe, J.H. 1982. Degradation kinetics of betanin in solutions as influenced by oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**, 708–712.
- Attoe, E.L. y von Elbe, J.H. 1985. Oxygen involvement in betanin degradation: effect of antioxidants. *Journal of Food Science* **50**, 106– 110.
- Azeredo, H.M.C. 2008. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology* **44**, 2365–2376.
- 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. *American Journal of Food Technology* **2**, 307–312.

- Barros, S.T.D., Andrade, C.M.G., Mendes, E.S. y Peres, L. 2003. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* **215**, 213-224.
- Bayindirli, A., Yildiz, F. y Özilgen M. 1988. Modeling of sequential batch ultrafiltration of red beet extract. *Journal of Food Science* **53** (5): 1418-1422.
- Bilyk, A., Kolodij, M.A. y Sapers, G.M. 1981. Stabilization of red beet pigments with isoascorbic acid. *Journal of Food Science* **46**, 1616-7.
- Butera, D. Tesoriere, L. Di Gaudio, F. Bongiorno, A. Allegra, M. y 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 of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6895-6901.
- Cai, Y. y Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried Amaranthus betacyanin pigments. *Journal of Food Science*. **65**, 1248- 1252.
- Cai, Y., Sun, M. y Corke, H. 1998. Colourant properties and stability of Amaranthus betacyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4491-4495.
- Cai, Y., Sun, M. y Corke, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2288-2294.
- Cai, Y., Sun, M. y Corke, H. 2005. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology* **16**, 370-376.
- Cancino-Madariaga, B., Kaiser, S., Kasahara, I., Díaz, P., Alvarez, J. y Astudillo, C. 2008. Pulsed Ultraviolet radiation, microfiltration and chlorine dioxide on *Alysiclobacillus acidoterrestris*. *Journal of Biotechnology* **137** (3S)
- Cancino-Madariaga, B., Ulloa, L. y Astudillo, C. 2009. Presión osmótica de soluciones salinas y azucaradas: su influencia en procesos de osmosis inversa en la industria de alimentos. *Revista Información Tecnológica* **20**, 55 - 65.
- Cancino-Madariaga, B., Hurtado, C. F. y Ruby, R. 2011. Effect of pressure and pH ammonium retention for nanofiltration and reverse osmosis membranes to be use in recirculation aquaculture systems (RAS). *Aquacultural Engineering* **45**, 103-108.

- Cancino-Madariaga, B., Ruby, R., Astudillo, C., Saavedra, J. y Lutz M. 2012. Analysis of the Membrane Fouling Mechanisms Involved in Clarified Grape Juice Ultrafiltration Using Statistical Tools. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **51**, 4017-4024
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M. y 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.
- Carvalho y da Silva. 2010. Clarification of pineapple juice by microfiltration. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **30**, 828-832.
- Cassano, A., Conidi, C. y Drioli, E. 2010. Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination* **250**, 1101–1104.
- Cassano, A., Conidi, C., Timpone, R., D'Avella, M. y Drioli, E. 2007. A membrane-based process for the clarification and concentration of cactus pear juice. *Journal of Food Engineering* **8**, 914–921.
- Castellar, M.R., Obón, J.M. y Fernández-López, J.A. 2006. The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 122-128.
- Castellar, M.R., Obón, J.M., Alacid, M. y Fernández-López, J.A. 2003. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2772-2776.
- Chen, L., Remondetto, G. E. y Subirade, M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 272-283.
- Cheryan, M. 1998. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Second edition. 527 p. CRS Press, Lancaster, U.S.A.
- Cissé, M., Vaillant, F., Pallet, D. and Dornier, M. 2011. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Food Research International* **44**, 2607-2614.

- Czapski, J. 1990. Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions. *European Food Research and Technology* **191**, 275–278.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. y Bartolomé, B. 2004. Applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) fluorescein assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 48-54.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R. y Paredes-Lopez, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**, 173–289.
- Desai, H y Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **23**, 1361-1394.
- Desobry, S., Nett, F. y Labuza, T. 1997. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for b-carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science* **62**, 1158-1162.
- Díaz, F., Santos, E.M., Filardo, S., Villagómez, R. y Scheinvar, L. 2006. Colorant extraction from a red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application. *Electronic Journal Environmental, Agricultural and Food Chemistry* **5**, 1330– 1337.
- Drunkler, D.A., Fett, R. y Bordignon-Luiz, M.T. 2006. Avaliação da estabilidade de betalinas em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) com a-, b- e c-ciclodextrinas. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* **24**, 259–276.
- Dziezak, J. 1998. Microencapsulation and encapsulated food ingredients. *Food Technology* **42**, 136 – 151.
- Espina, V., Jaffrin, M.Y., Ding, L. y Cancino, B. 2010. Fractionation of pasteurized skim milk proteins by dynamic filtration. *Food Research International* **43**, 1335-1346.
- Fang, Z. y Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols-A review. *Trends in Food Science and Technology* **21**, 510-523.
- Fernández-López, J. y 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.

- Fernández-López, J., Castellar, R., Obón, J.M. y Almela, L. 2002, Screening and Mass-Spectral Confirmation of Betalains in Cactus Pears. *Chromatographia* **56**, 591-595.
- Forni, E., Polesello, A., Montefiori, D. y Maestrelli, A. 1992. Highperformance liquid chromatographic analysis of the pigments of blood-red prickly pear (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of Chromatography* **593**, 177-183.
- Galati, E., Mondello, M., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S. y 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., y Escribano, J. 2010. Stabilization of the Bioactive Pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 10646-10652.
- Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, MA. y D'Alessio, P. 2004. Antioxidant betalains from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals of the New York Academy of 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., Kermasha, S., Alli, I. y Mulligan, C. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **50**, 213-224.
- Girard, B. y Fukumoto, L. R. 2000. Membrane processing of fruit juices and beverages: a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **40**, 91-157.
- Gouin, S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* **15**, 330-347.
- Han, D., Kim, S.J. y Kim, D.M. 1998. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. *Journal of Food Science* **63**, 69-72.

- Hayashi H. 1989. Drying technologies of foods – their history and future. *Drying Technology* **7**, 315-369.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2004. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science* **69**, C491-498.
- 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. y O’Sullivan, M. 2001. Microencapsulating proprieties of sodium caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 1934-1938.
- Huang A.S. y von Elbe JH. 1987. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science* **52**, 1689–93.
- Huang, A. S. y von Elbe, J. H. 1985. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science* **50**, 1115-1129.
- Kanner, J., Harel, S. y Granit, R. 2001. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and 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. y Morr, C.V. 1996. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: Spray-dried orange oil emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1314-1320.
- Kuti, J. 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry* **85**, 527–533
- Leopoldini, M., Russo, N. y Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* **125**, 288–306.
- Liu, X., Zhou, J., Zeng, Y. y Ouyang, X. 2004. The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering* **65**, 391-396.

- Livrea, M.A. y 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.
- Lozano, M. 2009. Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Univ. Politécnica de Cartagena. 68 pp.
- Martí-Calatayud, M.C., Vincent-Vela, M.C., Álvarez-Blanco, S. Lora-García, J. y Bergantiños-Rodríguez, E. 2010. Analysis and optimization of the influence of operating conditions in the ultrafiltration of macromolecules using a response surface methodological approach. *Chemical Engineering Journal* **156**, 337-346.
- Matsuhira, B., Lillo, L., Saénz, C., Urzúa, C. y Zárate, O. 2006. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Polymers* **63**, 263-267.
- Medina-Torres, L., García-Cruz, E.E., Calderas, F., González-Laredo, R.F., Sánchez-Olivares, G., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E. y Rodríguez-Ramírez, J. 2013. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*). *LWT - Food Science and Technology* **50**, 642-650.
- Merin, U., Gagel, S., Popel, G., Bernstein, S. y Rosenthal I. 1987. Thermal degradation kinetics of prickly-pear fruit red pigment. *Journal of Food Science* **52**, 485–486.
- Miletic, N., Popovic, B., Mitrovic, O. y Kandie, M. 2012. Phenolic content and antioxidant capacity of fruits of plum cv. “Stanley” (*Prunus domestica* L.) as influenced by maturity stage and on-tree ripening. *Australian Journal of Crop Science* **6**, 681-687.
- Morales, M., Sáenz, C. y Robert, P. 2008. Bioactives compounds in toppings from colored cactus pear cultivated in Chile. *Acta Horticulturae* **811**, 127-130.

- Moreno, D., García, C y Gil, J. 2008. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Rev* **7**, 261–280.
- Moßhammer, M. R., Rohe, M., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2007. Stability of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* [L.]Mill. cv. ‘Giulla’) betalains as affected by the juice matrix and selected food additives. *European Food Research and Technology* **225**, 21–32.
- Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2005. Development of a process for the production of a betalain-based colouring food stuff from cactus pear. *Innovative Food Science & Emerging Technology* **6**, 221– 231.
- Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2006. Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science & Emerging Technology* **7**, 275– 287.
- Murugesan, R y Orsat, V. 2012. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients – A Review. *Food Bioprocess Technology* **53**, 3-14.
- Obón, J.M., Castellar, M.R., Alacid, M. y Fernández-López, 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. y Domínguez-López, A. 1996 Le figuier de barbarie: Une source industrielle de betalaines?. *Fruits* **51**:61-78
- Osborne, D. R. y Voogt, P. 1986. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- Pap, N., Mahosenaho, M., Pongrácz, E., Mikkonen, H., Jaakkola, M., Virtanen, V., Myllykoski, L., Horváth-Hovorka, Z., Hodúr, C., Vatai, G. y Keiskiaho, R. 2010. Effect of ultrafiltration on anthocyanin and flavonol content of black currant juice (*Ribesnigrum* L.). *Food and Bioprocess Technology* **5**, 921-928.
- Pátkai, G. y Barta, J. Decomposition of betacyanins and betaxanthins by heat and pH changes. *Nahrung* **40**, 267-270.
- Pedroza, R. 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México.

- Piga, A. 2004. Cactus pear: a fruit of nutraceutical and functional importance. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **6**, 9-22.
- Pimienta-Barrios, E. y del Castillo, R.F. 2002. Reproductive biology. pp75-90 In: *Cacti, Biology and uses*. Park S. Nobel (ed). University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, U.S.A.
- Pitalua, A., Jimenez, E., Vernon-Carter, C. y Beristain, C. 2010. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing* **88**, 253-258
- Rai, P., Rai, C., Majumdar, G. C., DasGupta, S. y De, S. 2006. Resistance in series model for ultrafiltration of mosambi (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice in a stirred continuous mode. *Journal of Membrane Science* **283**, 116-122.
- Raventós, M. 2005. Tecnología de membranas. En: *Industria alimentaria tecnologías emergentes*. Ediciones UPC. Barcelona. pp 173-210.
- Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N.M.M.T., Gabr, A.M.M., Ahmed, A.R., Knorr, D., y Smetanska, I. 2012. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology* published On-Line. DOI 10.1007/s13197-012-0728-9.
- Ré, I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology* **16**, 195-1236.
- Real E. y Cerezal, P. 1995. Estudio de los parámetros de operación en la ultrafiltración del jugo de remolacha para colorante. *La Alimentación Latinoamericana* **206**, 34-40.
- Reynoso, R., Garcia, F.A., Morales, D. y Gonzáles de Mejía E. 1997. Stability of betalain pigments from Cactacea fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**:2884–2889.
- Robert, P., Carlsson, R.M., Romero, N. y Masson L. 2003. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **80** (11): 1115-1120.
- Rodríguez-Hernández, G.R., Gonzáles, R., Grajales, A. y Ruiz M.A. 2005. Spray-Drying of Cactus Pear Juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the Physicochemical Properties of Powder and Reconstituted Product. *Drying Technology* **23**: 955-973.

- Romero, R. y Zuñica, L. 2005. Métodos Estadísticos en Ingeniería. 2ª edición. Ed. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ruby, R., Cassano, A. y Drioli, E. 2011. Ultrafiltration of orange press liquor: Optimization for permeate flux and fouling index by response surface methodology. *Separation and Purification Technology* **80**, 1-10.
- Rudra, S., Singh, H., Basu, S. y Shivare, U. 2008. Enthalpy entropy compensation during thermal degradation of chlorophyll in mint and coriander puree. *Journal of Food Engineering* **86**,379-387.
- 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.
- Sáenz, C. y Sepúlveda, E. 2001. Ecotipos coloreados de tuna (*Opuntia ficus-indica*). *Aconex* **72**, 29-32.
- Sáenz, C., Sepúlveda, E. y Matsuhiro, B. 2004. Opuntia spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments* **57**, 275–290.
- Sáenz, C., Tapia S., Chavez, J. y Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* **114**, 616–622.
- Saguy, I. 1979. Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-D): Influence of pH and temperature. *Journal of Food Science* **44**, 1554-1555.
- Saguy, I., Kopelman, I.J. y Mizrahi S. 1978. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**, 360–2.
- Santinho, A.J.P., Ureta, J.M., Freitas, O. y Pereira N.L. 2002. Physicochemical characterization and enzymatic degradation of casein microcapsules prepared by aqueous coacervation. *Journal of Microencapsulation* **19**, 549-559.
- Sapers, G. M. y Hornstein, J. S. 1979. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science* **44**, 1245-1248.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C. y 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.
- Serris, G.S. y Biliaderis, C.G. 2001. Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 691–700.
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. y Liu, X. 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering* **76**, 664-669.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144–158.
- Souza, T.C.R., Parize, A.L., Brighente, I.M.C., Fávere, V.T. y Laranjeira, M.C.M. 2005. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. *Journal of Microencapsulation* **22**, 511-520.
- Sreekantah, D.S., Arunasree, M.K., Roy, K.R., Reddy, T.C., Reddy, G.V. y Reddanna, P. 2007. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine* **14**, 739–746.
- Stintzing, F. y Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Science Technology* **15**, 19-38.
- Stintzing, F., Herbach, K., Moßhammer, M., Carle R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh C. y Felker, P. 2005. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 442-451.
- Stintzing, F.C., Schieber, A. y Carle, R. 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology* **212**, 396–407.
- Stintzing, F.C., Schieber, A. y Carle, R. 2002. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2302–2307.

- 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. 69p.
- Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D. y Livrea, MA. 2004a. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**, 941–945.
- Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M. y Livrea, M.A. 2005. Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1266-1270.
- Tesoriere, L., Butera, D., D’Arpa, D., Di Gaudio, F., Allegra, M., Gentile, C. y Livrea, MA. 2003. Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radical Res* **37**, 689–696.
- Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A.M., Allegra, M. y Livrea, M.A. 2004b. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**, 391-395.
- Todisco, S., Tallarico, P. y Gupta, B. 2002. Mass transfer and polyphenols retention in the clarification of black tea with ceramic membranes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **3**, 255–262
- Torres, V. 2008. Microencapsulación de “polifenoles y betalainas” desde un extracto acuoso de tuna (*Opuntia ficus-indica*), mediante secado por atomización. Universidad Tecnológica Metropolitana.
- Tsuda, S., Murakami, M., Kano, K., Taniguchi, K. y Sasaki, Y.F. 2001. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences* **61**, 92-99.
- Vaillant, F., Pérez, A., Dávila, I., Dornier, M. y Reynes, M. 2005. Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits* **60**, 1–10.

- von Elbe, J.H., Maing, I.Y. y Amundson, C.H. 1974. Color stability of betanin. *Journal of Food Science* **39**, 334-337.
- von Elbe, J.H., Schwartz, S.J. y Hildenbrand, B.E. 1981. Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *J Food Science* **46**, 1713–1715.
- Wagner, L. y Warthesen, J. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science* **60**, 1048-1053.
- Wang, J.P., Zhao, X.P., Guo, H.L. y Zheng Q. 2004. Preparation of microcapsules containing two-phase core materials. *Langmuir* **20**, 10845-10850.
- Wu, L., Hsu, H.W., Chen, Y.C., Chiu, CC., Lin, YI. y Ho, JA. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry* **95**, 319-327.
- Yáñez-Fernández, J., Salazar-Montoya, J.A., Chaires-Martínez, L., Jiménez-Hernández, J., Márquez-Robles, M. y Ramos-Ramírez, E.G. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* **21**, 313-319.
- Zakarian, A.J. y King, C.J. 1982. Volatiles loss in the zone during spray drying of emulsions. *Industrial Engineering Chemistry Process Design and Development* **21**, 107–113.

ANEXOS

Anexo 1

Publicaciones

Vergara, C., Cancino, B., Robert, P., Sáenz, C. y Ramirez, A. Clarification of purple cactus pear juice with microfiltration membranes to obtain a solution of betalain pigments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. (Sometido).

Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C. y Robert, P. Microencapsulation of ultrafiltered purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extract and stability of betalaínas. *Journal of Microencapsulation*. (Sometido).

Estadía

La encapsulación como herramienta para estabilizar betalaínas de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*): comparación de métodos de gelificación iónica y secado por atomización. Departamento de Alimentos y Nutrición. Facultad de Ingeniería en Alimentos. UNICAMP, Campinas, Brasil. Investigador Responsable estadía: Dr. Carlos R.F. Grosso. Marzo-Junio 2013.

Presentaciones en Congresos

- **Vergara, C.**, Sáenz, C., Cancino, B., Saavedra, J. y Robert, P. Use of capsul and k4484 as encapsulating agents to prepare microparticles of purple cactus pear pulp (*Opuntia ficus-indica*). 16th World Congress of Food Science and Technology-IUFOST. Brazil. 2012.
- Sáenz, C., Cancino, B., **Vergara, C.**, Ramirez, A., y Robert, P. Ceramic membranes fractionation to obtain betalain pigment from cactus pear juice. 16th World Congress of Food Science and Technology-IUFOST. Brazil. 2012.

- **Vergara, C., Sáenz, C., Cancino, B., Saavedra, J. y Robert, P.** Purple cactus pear pulp (*Opuntia ficus-indica*) microparticles with capsules as encapsulating agent. South-American Symposium on Microencapsulation. Limeira, Brazil, 2012.
- **Vergara, C., Robert, P., Sáenz, C., Ramírez, A y Cancino, B.** Microfiltración de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*): Selección de material de membrana, condiciones de proceso y escalamiento. VIII congreso Iberoamericano en Ciencias y Tecnologías de Membranas (CITEM). Argentina, 2012.
- **Vergara, C., Robert, P., Sáenz, C., Ramírez, A. y Cancino, B.** Obtención de betalaínas de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) por microfiltración XVIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. SOCHITAL. Valdivia. 2011.
- **Vergara, C., Robert, P., Sáenz, C. y Cancino, B.** Clarificación de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) por microfiltración. VIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos- CIBIA. Lima. Perú. 2011

Presentaciones aceptadas en congresos

- **Vergara, C., Robert, P., Sáenz, C. y Grosso, C.** Cactus pear pulp (*Opuntia ficus-indica*) encapsulation by external and internal ionic gelation technology. VIII International Congress on Cactus Pear and Cochineal & 20th Cactusnet anniversary October 28-31, 2013 Palermo, Italia.

Otras presentaciones

Mini-symposium: “Current research in *Opuntia ficus-indica* at the University of the Free State (UFS), South Africa and the University of Chile (UCH)”. 10 de Septiembre de 2012, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Título de presentación: “Clarification of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by microfiltration”.

Workshop de Microencapsulación: Potencial Herramienta para la Industria Alimentaria. 27 y 28 de Agosto de 2013, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Título de presentación: “Encapsulación de colorantes naturales de tuna púrpura para funcionalizar alimentos”.

Anexo 2

Determinación del contenido de azúcares totales por el método de la 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 52%, reactivo de Antrona, solución de glucosa (0,03; 0,05; 0,07; 0,1; 0,15 y 0,17%), agua destilada.

Procedimiento

Se pesaron 2 g de muestra húmeda, en un matraz erlenmeyer con tapa y se mezclaron con 10 mL de agua destilada y 15 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, se adicionó agua destilada hasta 100 mL aproximadamente, 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 llevó a un baño a temperatura de ebullición por 12 minutos; luego, se enfrió rápidamente con agua fría y se leyó en un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK) a una longitud de onda de 620 nm. Paralelamente se preparó un tubo con 1 mL de agua destilada más los 5 mL de reactivo de Antrona (blanco) y un set de 6 tubos con 1 mL de soluciones de glucosa entre (0,03; 0,05; 0,07; 0,1; 0,15 y 0,17%) más los 5 mL de reactivo de Antrona en cada uno para realizar la curva de calibración.

Para los cálculos del contenido de azúcares totales, se realizó una curva de calibrado de glucosa (Figura 18) ($Y=4,564X + 0,046$; $R^2=0,99$, Donde: X= Concentración de glucosa y Y= Absorbancia de la muestra (U.A.)).

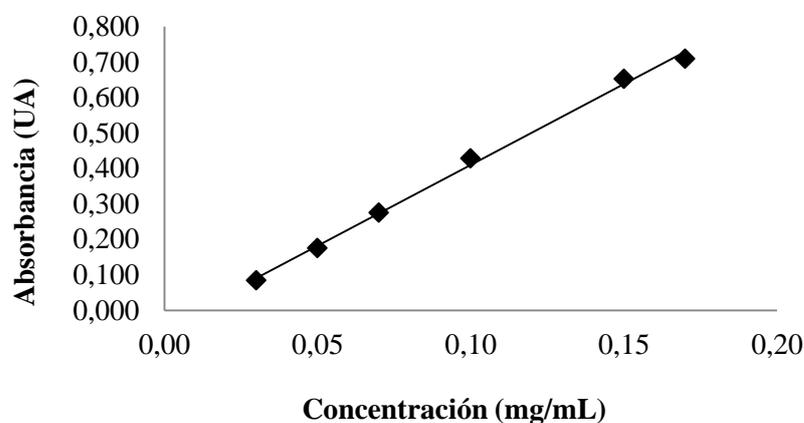


Figura 18. Curva de calibración de glucosa

Preparación de soluciones:

1.- Ácido perclórico al 52%: se añadieron 270 mL de ácido perclórico (peso específico 1,7) a 100 ml de agua. Esta mezcla se realizó en un baño de agua fría para enfriar la mezcla.

2.- Ácido sulfúrico al 76%: se preparó añadiendo cuidadosamente 760 ml de ácido (peso específico 1,84) a 330 mL de agua destilada. La mezcla se enfrió antes de usar.

3.- Reactivo de Antrona: se preparó al 0,1% disolviendo el reactivo en el ácido sulfúrico al 76%. Se preparó solo la cantidad suficiente para los análisis del día.

4.- Soluciones de glucosa: primero disolver 100 mg de glucosa en 100 ml de agua destilada, luego diluir 3, 5, 7, 10, 15 y 17 ml de esta solución en matraces de aforo de 100 ml aforando con agua destilada. Preparar una curva de calibración con glucosa.

Anexo 3

Determinación del contenido de betalainas por espectrofotometría (Stintzing *et al.*, 2005)

Materiales

Buffer McIlvaine pH 6,5

Procedimiento

Pulpa de tuna: Se pesaron 4 g de muestra de pulpa y se aforó con agua destilada en un matraz de aforo de 25 mL, posteriormente se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm en una centrifuga Hettich ROTOFIX 32 (Alemania), el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0,22 μm , se tomó una alícuota de 1 mL que se aforó en un matraz de 10 mL con la solución buffer McIlvaine pH 6,5. Luego se leyó en un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK) a longitudes de onda de 480, 538 y 600 nm, respectivamente.

Extracto Ultrafiltrado: Se tomó una alícuota de 0,25 mL y se aforó con la solución de McIlvaine en un matraz de 10 mL. Luego se leyó en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 480, 538 y 600 nm, respectivamente.

Betalainas totales y superficiales de las micropartículas:

- **Contenido betalainas totales:** se pesaron micropartículas (100 mg) de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K y se adicionaron 2 mL de metanol:ácido acético:agua (50:8:42 v/v/v), se agitó en un vortex (1 min), se sonicó por 50 min y luego se centrifugo a 11200g por 5 min. Se tomó 1 mL de la muestra preparada y se aforó con reactivo buffer McIlvaine en un matraz de aforo de 10 mL. Luego se leyó en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 480, 538 y 600 nm, respectivamente.
- **Contenido de betalainas superficiales:** se pesaron micropartículas (200 mg) de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K y se adicionaron 2 mL de etanol:metanol (1:1 v/v) la solución fue agitada en un vortex (1 min) y luego centrifugada a 11200 g por 5 min. Se tomó 1 mL de la muestra preparada y se

aforó con reactivo buffer McIlvaine en un matraz de aforo de 10 mL. Luego se leyó en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 480, 538 y 600 nm, respectivamente.

Betalainas en la mezcla seca: se pesaron (100 mg) de las mezclas secas formuladas con los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K y se adicionaron 2 mL de metanol:ácido acético:agua (50:8:42 v/v/v), se agitó en un vortex (1 min), se sonicó por 50 min y luego se centrifugo a 11200g por 5 min. Se tomó 1 mL de la muestra preparada y se aforó con reactivo buffer McIlvaine en un matraz de aforo de 10 mL. Luego se leyó en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 480, 538 y 600 nm, respectivamente.

El contenido de betacianinas y betaxantinas, expresado como betanina e indicaxantina, respectivamente, se calculó como se describe ecuación 14:

$$B = \frac{AxFDxPMxVx1000}{\epsilon xLxP} \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde:

B = contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) (mg/g) expresado como equivalente de betanina o indicaxantina.

A = diferencia de absorvancia entre la muestra y su respectivo factor de corrección a 600 nm.

FD = factor de dilución.

PM = peso molecular: betaninas 550 g/mol e indicaxantinas 308 g/mol.

V = volumen inicial al que es llevado la muestra.

ϵ = coeficiente de extinción molar: betaninas 60000 L/mol*cm e indicaxantinas 48000 L/mol*cm.

L = distancia que recorre la luz en la cubeta (1 cm).

P = peso de la muestra (g).

Preparación buffer McIlvaine pH 6,5:

Solución A = 0,1M Ácido Cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot 1H_2O$) = 21,01 g/L

Solución B = 0,2M Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) = 35,60 g/L

- pH 6,5 = 29,65ml A + 70,35ml B

Anexo 4

Identificación de betalainas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Fernández-López y Almela, 2001).

Materiales

Columna C18 (5µm de tamaño de partícula y 25cm x 4,6mm d.i., Waters), Ácido Acético Glacial, Agua HPLC y Acetonitrilo.

Procedimiento:

Se utilizó una bomba Merck – Hitachi L-6200 con detector de arreglo de diodos (Waters 996), acoplado a un software Millennium 32; se empleó una columna C18 (5µm de tamaño de partícula y 25cm x 4,6mm d.i., Waters). La fase móvil correspondió a un solvente A (1% de ácido acético en agua) y un solvente B (1% de ácido acético en acetonitrilo), se empleó un gradiente lineal en un tiempo de 30 minutos con elusión del solvente A, desde un 100% a un 88% y el solvente B desde un 0% a un 12%, con un flujo de 1 mL//min. El volumen de inyección fue de 20µL. Las betalainas se detectaron simultáneamente a longitudes de onda de 484 y 535nm para betaxantinas y betacianinas, respectivamente.

Anexo 5

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%.

Procedimiento

Preparación de la muestra de pulpa

Se pesó 8 g 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 0,22 μm .

Método Folin-Ciocalteu

En un matraz aforado de 10 mL se colocó 0,1 mL de muestra 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. En paralelo se preparó un blanco en cual se adicionó 5 mL de agua destilada, siguiendo el mismo procedimiento para la muestra. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm.

Para los cálculos del contenido de polifenoles totales, se realizó una curva de calibrado de ácido gálico (Figura 19) ($Y=0,001X + 0,065$; $R^2=0,99$, Donde: X= Concentración de polifenoles y Y= Absorbancia de la muestra (U.A.)).

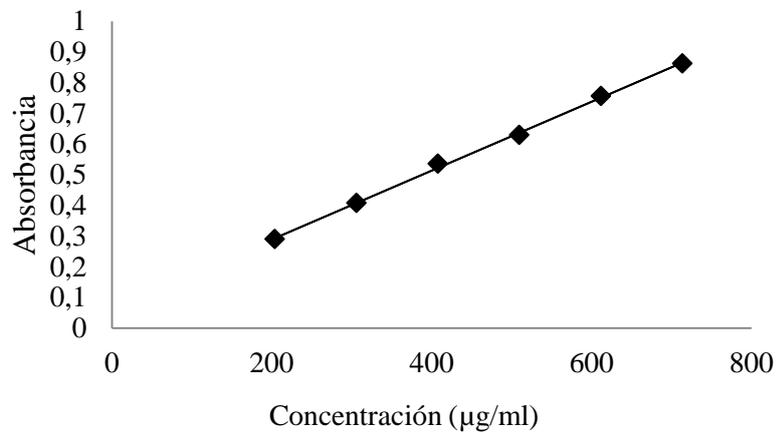


Figura 19. Curva de calibración de ácido gálico

Preparación Carbonato de sodio 20%:

Se preparó la solución de carbonato de sodio al 20% de la siguiente forma: Se pesaron 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.

Anexo 6

Determinación del tiempo de mezcla

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 E1122 Specification, Malla N°50). La mezcla se efectuó 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 mezcla de los polvos, se tomaron muestras en cinco puntos de la bolsa cada 5 minutos durante 20 minutos, a cada muestra se le determinó el contenido de betacianinas y se calculó el coeficiente de variación.

La Figura 20 muestra el coeficiente de variación (CV) de betacianinas frente al tiempo de mezcla para la formulación de mezcla seca con micropartículas del sistema P-C. El tiempo óptimo de mezcla fue 12 minutos.

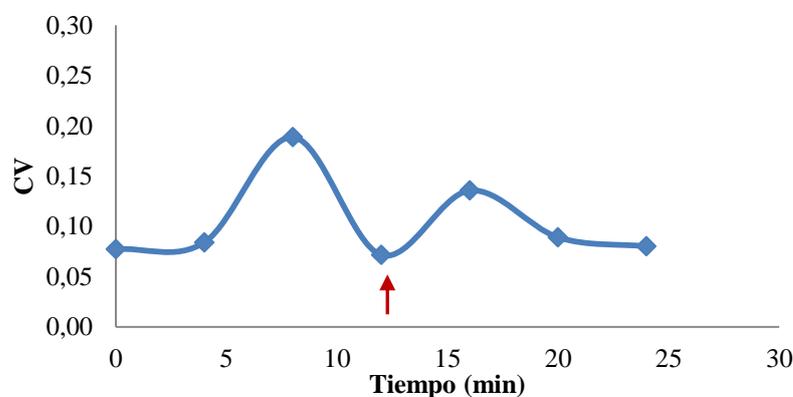


Figura 20. Coeficiente de variación (CV) de betacianinas *versus* tiempo de mezcla para la formulación de mezcla seca con micropartículas del sistema P-C

Anexo 7

Análisis de varianza – Optimización diseño ultrafiltración membrana polimérica

Tabla 22. Análisis de la varianza para la optimización de ultrafiltración con membrana polimérica

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Temperatura	0,000900811	1	0,000900811	0,01	0,9255
B:PTM	0,183002	1	0,183002	1,93	0,2141
AA	0,726566	1	0,726566	7,66	0,0325
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BB	0,409928	1	0,409928	4,32	0,0828
Error total	0,568768	6	0,0947947		
Total (corr.)	1,88917	11			

R-cuadrada = 69,8932 porciento

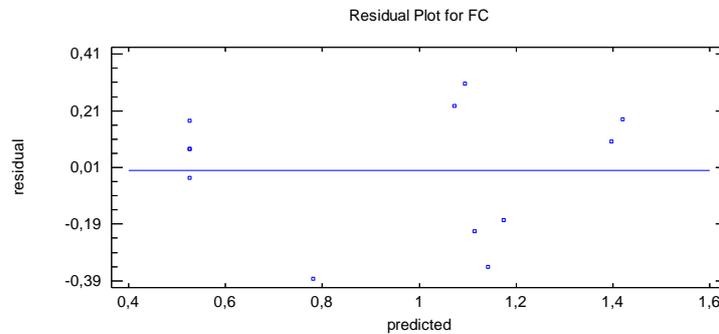
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 44,8041 porciento

Error estándar del est. = 0,307888

Error absoluto medio = 0,189702

Estadístico Durbin-Watson = 0,740073 (P=0,0047)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,543425



Optimizar Respuesta

Meta: maximizar FC

Valor óptimo = 1,79137

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	18,95	31,05	18,95
PTM	1,1595	8,5405	8,5405

Análisis de varianza – Optimización diseño ultrafiltración membrana cerámica

Tabla 23. Análisis de la varianza para la optimización de FC en el proceso de ultrafiltración con membrana cerámica

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A: Temperatura	0,0750326	1	0,0750326	4,04	0,0913
B: PTM	0,652388	1	0,652388	35,10	0,0010
AA	0,434548	1	0,434548	23,38	0,0029
AB	0,25	1	0,25	13,45	0,0105
BB	1,02568	1	1,02568	55,18	0,0003
Error total	0,111521	6	0,0185868		
Total (corr.)	2,54917	11			

R-cuadrada = 95,6252 porciento

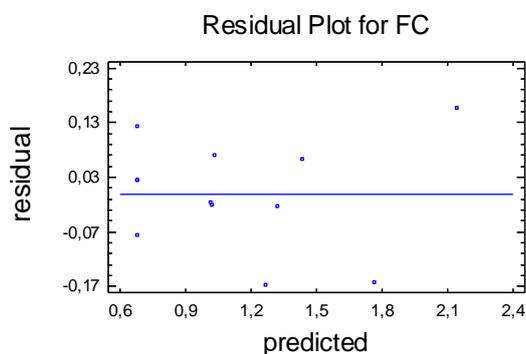
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 92,796 porciento

Error estándar del est. = 0,136333

Error absoluto medio = 0,0773049

Estadístico Durbin-Watson = 1,51658 (P=0,1614)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,236835



Optimizar Respuesta

Meta: maximizar FC

Valor óptimo = 2,72096

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	18,95	31,05	31,05
PTM	1,1595	8,5405	8,5405

Anexo 8

Ánalysis de varianza - Optimizacion sistema de microparticulas P-C

Tabla 24. Análisis de la varianza para la variable respuesta EE Betacianinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación P/Capsul	11,11	1	11,11	95,75	0,0000
B:Temperatura	2,201	1	2,201	18,98	0,0033
AA	3,855	1	3,855	33,23	0,0007
AB	2,403	1	2,403	20,71	0,0026
Total error	0,8119	7	0,116		
Total (corr,)	20,38	11			

R-cuadrada = 96,02 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 93,74 porciento

Error estándar del est. = 0,3406

Error absoluto medio = 0,2191

Estadístico Durbin-Watson = 1,819 (P=0,4031)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,02995

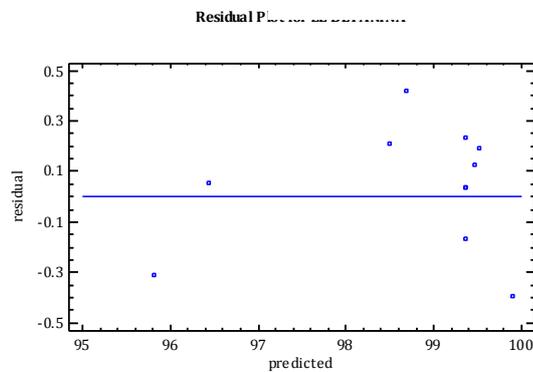


Tabla 25. Análisis de la varianza para la variable respuesta EE betaxantinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación P/Capsul	3,87	1	3,87	44,45	0,0003
B:Temperatura	0,705	1	0,705	8,10	0,0248
AA	4,875	1	4,875	55,99	0,0001
AB	0,25	1	0,25	2,87	0,1340
Total error	0,6094	7	0,08706		
Total (corr.)	10,31	11			

R-cuadrada = 94,09 por ciento

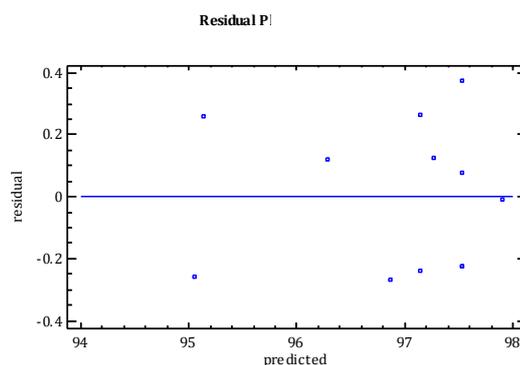
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 90,71 por ciento

Error estándar del est. = 0,2951

Error absoluto medio = 0,2036

Estadístico Durbin-Watson = 1,67 (P=0,2806)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,06902



Optimización conjunta

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo=1,0

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Relación P/Capsul	0,58	5,42	3,423
Temperatura	132,7	217,3	133,5

<i>Respuesta</i>	<i>óptimo</i>
EE Betaxantinas	97,95
EE Betacianinas	100,1

Ánalysis de varianza - Optimizacion sistema de microparticulas P-K

Tabla 26 Análisis de la varianza para la variable respuesta EE Betacianinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación P/K4484	9,367	1	9,367	6,50	0,0435
B:Temperatura	0,0186	1	0,0186	0,01	0,9133
AA	35,76	1	35,76	24,81	0,0025
AB	6,502	1	6,502	4,51	0,0778
BB	15,3	1	15,3	10,61	0,0173
Total error	8,647	6	1,441		
Total (corr.)	75,65	11			

R-cuadrada = 88,57 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 79,04 porciento

Error estándar del est. = 1,201

Error absoluto medio = 0,7654

Estadístico Durbin-Watson = 1,829 (P=0,3308)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,03606

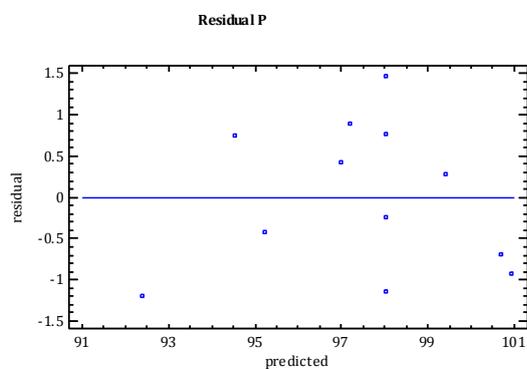


Tabla 27 Análisis de la varianza para la variable respuesta EE Betaxantinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación P/K4484	32,55	1	32,55	61,80	0,0001
B:Temperatura	0,08082	1	0,08082	0,15	0,7069
AA	52,1	1	52,1	98,92	0,0000
AB	32,49	1	32,49	61,68	0,0001
Total error	3,687	7	0,5267		
Total (corr.)	120,9	11			
A:Razón Encap	32,55	1	32,55	61,80	0,0001

R-cuadrada = 96,95 porciento

R-cuadrada (ajustada por g,l,) = 95,21 porciento

Error estándar del est, = 0,7258

Error absoluto medio = 0,5007

Estadístico Durbin-Watson = 1,933 (P=0,4822)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,1050

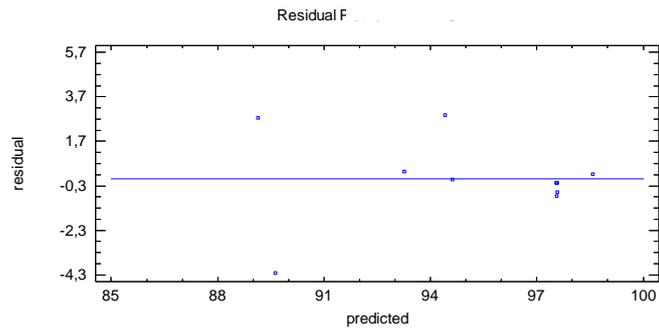


Tabla 28. Análisis de la varianza para la variable respuesta rendimiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación P/K4484	118,4	1	118,4	11,46	0,0096
B:Temperatura	3,992	1	3,992	0,39	0,5515
AB	51,12	1	51,12	4,95	0,0568
Total error	82,64	8	10,33		
Total (corr.)	256,1	11			
A:Razón Encap	118,4	1	118,4	11,46	0,0096
B:Temperatura	3,992	1	3,992	0,39	0,5515

R-cuadrada = 67,74 por ciento

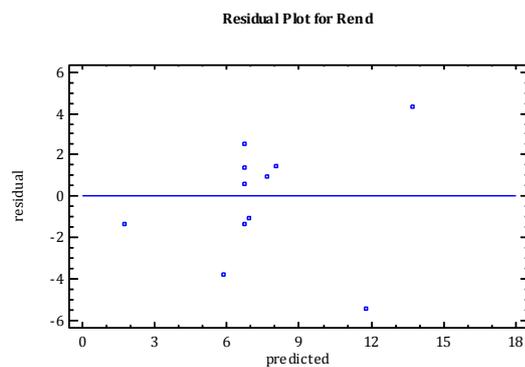
R-cuadrada (ajustada por g,l,) = 55,64 por ciento

Error estándar del est, = 3,214

Error absoluto medio = 2,171

Estadístico Durbin-Watson = 1,892 (P=0,5821)

Autocorrelación residual de Lag 1 =0,002084



Optimización conjunta

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo=0,7172

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Relación P/K4484	0,58	5,42	2,701
Temperatura	110,0	219,0	110,0

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
Rendimiento	7,635
EE Betacianinas	100,9
EE betaxantinas	97,56

Ánàlisis de varianza - Optimizacion sistema de microparticulas UF-C

Tabla 29. Análisis de la varianza para la variable respuesta EE Betacianinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/Capsul	36,67	1	36,67	70,98	0,0001
B:Temperatura	0,3793	1	0,3793	0,73	0,4199
AA	3,437	1	3,437	6,65	0,0365
AB	2,402	1	2,402	4,65	0,0680
Total error	3,617	7	0,5167		
Total (corr.)	46,51	11			
A:Razón Pulpa	36,67	1	36,67	70,98	0,0001

R-cuadrada = 92,22 porciento

R-cuadrada (ajustada por g,l,) = 87,78 porciento

Error estándar del est, = 0,718

Error absoluto medio = 0,4818

Estadístico Durbin-Watson = 1,762 (P=0,3541)

Autocorrelación residual de Lag 1 =-0,06236

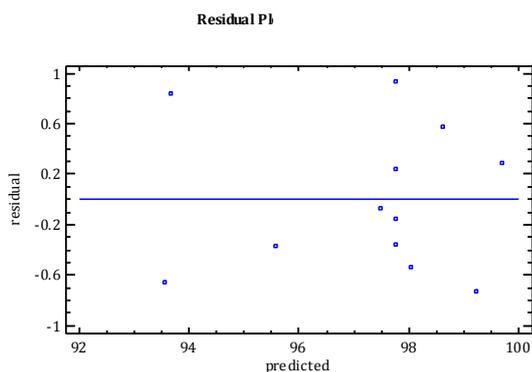


Tabla 30. Análisis de la varianza para la variable respuesta EE betaxantinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/Capsul	35,85	1	35,85	173,33	0,0000
B:Temperatura	2,658	1	2,658	12,85	0,0089
AA	17,18	1	17,18	83,08	0,0000
AB	1,562	1	1,562	7,55	0,0286
Total error	1,448	7	0,2068		
Total (corr.)	58,7	11			
A:Razón Pulpa	35,85	1	35,85	173,33	0,0000

R-cuadrada = 97,53 porciento

R-cuadrada (ajustada por g,l,) = 96,12 porciento

Error estándar del est, = 0,4548

Error absoluto medio = 0,2879

Estadístico Durbin-Watson = 1,97 (P=0,5363)

Autocorrelación residual de Lag 1 =-0,006831

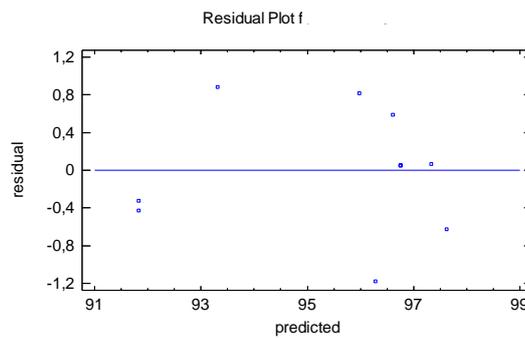


Tabla 31. Análisis de la varianza para la variable respuesta recuperación de betacianinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/Capsul	63,89	1	63,89	4,01	0,0852
B:Temperatura	60,43	1	60,43	3,80	0,0924
AA	98,01	1	98,01	6,16	0,0421
AB	201,6	1	201,6	12,67	0,0092
Total error	111,4	7	15,92		
Total (corr,)	535,4	11			
A:Razón Pulpa	63,89	1	63,89	4,01	0,0852

R-cuadrada = 79,19 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g,l,) = 67,3 por ciento

Error estándar del est, = 3,99

Error absoluto medio = 2,72

Estadístico Durbin-Watson = 2,306 (P=0,7996)

Autocorrelación residual de Lag 1 =-0,1915

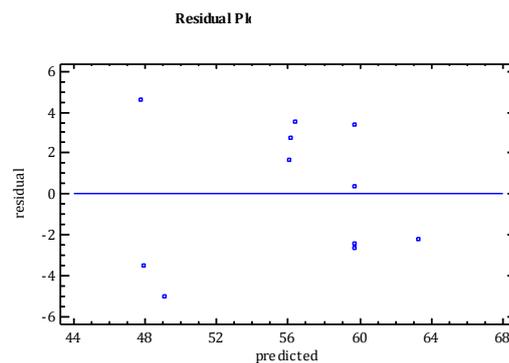


Tabla 32. Análisis de la varianza para la variable respuesta recuperación de betaxantina

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/Capsul	59,01	1	59,01	32,85	0,0105
B:Temperatura	120,9	1	120,9	67,28	0,0038
AA	57,28	1	57,28	31,88	0,0110
AB	324,0	1	324,0	180,33	0,0009
BB	12,52	1	12,52	6,97	0,0777
Pure error	5,39	3	1,797		
Total (corr.)	626,9	11			

R-cuadrada = 91,52 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 84,45 por ciento

Error estándar del est. = 1,34

Error absoluto medio = 1,677

Estadístico Durbin-Watson = 1,511 (P=0,2030)

Autocorrelación residual de Lag 1 =0,1912

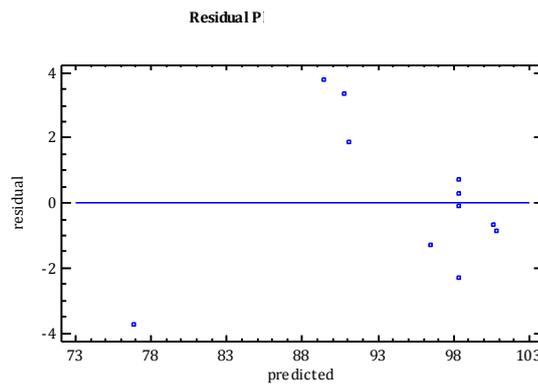


Tabla 33. Análisis de la varianza para la variable respuesta rendimiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/Capsul	362,0	1	362,0	533,26	0,0000
B:Temperatura AA	0,7669	1	0,7669	1,13	0,3231
BB	126.3	1	126.3	186.11	0.0000
Total error	1.273	1	1.273	1.88	0.2131
Total (corr.)	4.752	7	0.6788		
	495.1	11			

R-cuadrada = 99.04 por ciento

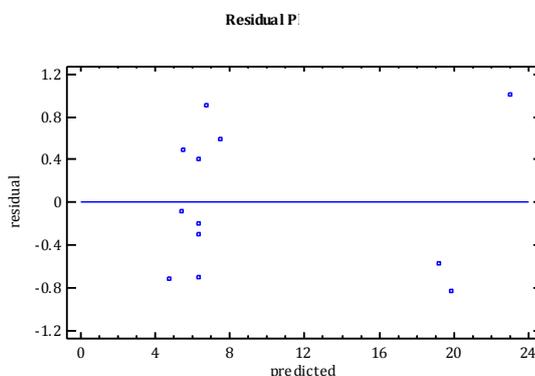
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.49 por ciento

Error estándar del est. = 0.8239

Error absoluto medio = 0.5671

Estadístico Durbin-Watson = 1.229 (P=0,0449)

Autocorrelación residual de Lag 1 =0,3025



Optimización conjunta

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo=0,6196

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Relación UF/Capsul	0,58	5,42	2,476
Temperatura	132,7	217,3	132,7

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
R Betacianinas	59,92
R Betaxantinas	98,5
Rendimiento	8,962
EE Betacianinas	97,62
EE Betaxantinas	97,34

Ánalysis de varianza - Optimizacion sistema de microparticulas UF-K

Tabla 34. Análisis de la varianza para la variable respuesta EE Betacianinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/K4484	0,05857	1	0,05857	0,71	0,4322
B:Temperatura	0,1023	1	0,1023	1,24	0,3085
AA	0,06958	1	0,06958	0,84	0,3943
AB	2,25	1	2,25	27,22	0,0020
BB	1,751	1	1,751	21,18	0,0037
Total error	0,496	6	0,08266		
Total (corr.)	4,727	11			

R-cuadrada = 89,51 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 80,76 porciento

Error estándar del est. = 0,2875

Error absoluto medio = 0,1773

Estadístico Durbin-Watson = 2,35 (P=0,6772)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,196

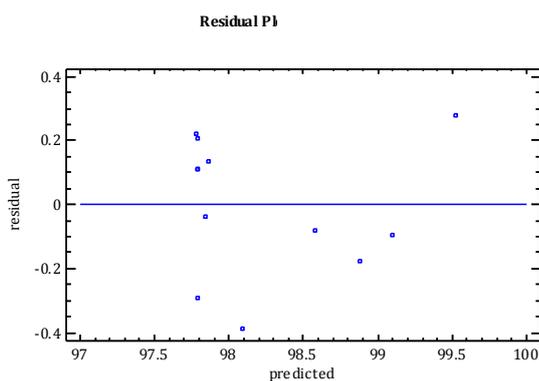


Tabla 35. Análisis de la varianza para la variable respuesta EE betaxantinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/K4484	0,9057	1	0,9057	8,78	0,0210
B:Temperatura	0,002917	1	0,002917	0,03	0,8712
AA	2,956	1	2,956	28,66	0,0011
AB	3,803	1	3,803	36,87	0,0005
Total error	0,7219	7	0,1031		
Total (corr,)	8,389	11			

R-cuadrada = 91,39 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 86,48 por ciento

Error estándar del est. = 0,3211

Error absoluto medio = 0,2127

Estadístico Durbin-Watson = 1,291 (P=0,1084)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,319

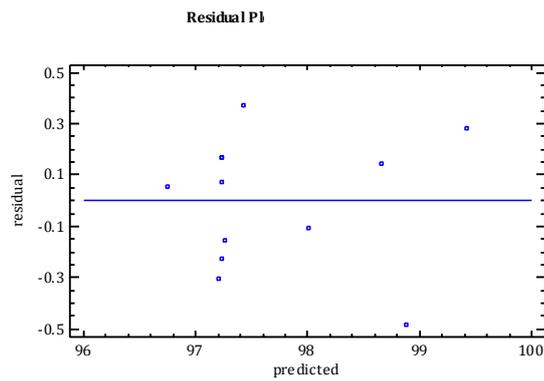


Tabla 36. Análisis de la varianza para la variable respuesta rendimiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación UF/K4484	168,1	1	168,1	112,40	0,0000
B:Temperatura	0,8018	1	0,8018	0,54	0,4879
AA	17,92	1	17,92	11,98	0,0105
AB	10,24	1	10,24	6,85	0,0346
Total error	10,47	7	1,496		
Total (corr,)	207,6	11			

R-cuadrada = 94,96 por ciento

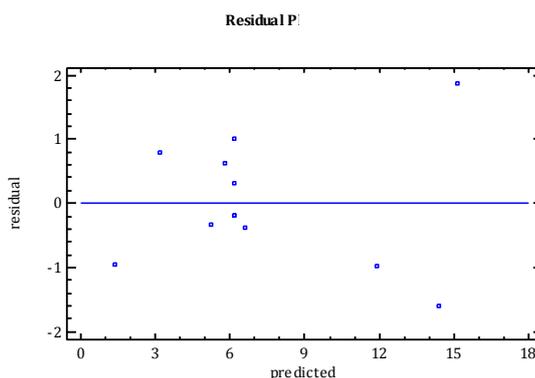
R-cuadrada (ajustada por g,l,) = 92,07 por ciento

Error estándar del est, = 1,223

Error absoluto medio = 0,7726

Estadístico Durbin-Watson = 1,613 (P=0,2664)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,1455



Optimización conjunta

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo=0,8796

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Relación UF/K4484	0,58	5,42	0,58
Temperatura	110,5	219,5	110,5

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
EE Betacianinas	99,75
EE Betaxantinas	99,41
Rendimiento	13,2

Anexo 9

Retención (%) de betacianinas en el tiempo de almacenamiento a 30, 45 y 60°C.

Tabla .37. Retención (%) de betacianinas en el tiempo de almacenamiento a 30°C

Tiempo (días)	P-C		P-K		UF-C		UF-K	
	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)
0	0,358	100,0	0,339	100,00	0,361	100,0	0,343	100,0
7	0,346	96,6	0,378	100,00	0,373	100,0	0,265	98,0
14	0,319	88,8	0,331	98,50	0,356	98,0	0,292	91,5
21	0,304	85,1	--	--	0,331	91,8	--	--
28	0,299	83,7	0,328	97,45	0,331	91,6	0,263	79,5
35	0,280	78,9	--	--	0,316	87,6	--	--
42	0,277	75,2	0,309	93,65	0,301	83,4	0,291	84,9
56	0,274	76,5	0,316	94,02	0,290	82,0	0,284	83,3
70	--	--	0,298	87,94	--	--	0,278	81,2
77	0,272	76,4	0,291	85,90	0,287	80,2	0,274	79,8
91	0,268	75,1	--	--	0,277	76,7	--	--
98	0,262	73,3	--	--	0,272	75,8	--	--
105	0,251	70,1	0,278	82,14	0,261	71,8	0,247	72,1
119	0,246	68,9	--	--	0,253	70,2	--	--
161	--	--	0,234	69,16	--	--	0,216	63,1
175	0,207	58,0	--	--	0,216	59,8	--	--
217	--	--	0,209	61,66	--	--	0,181	52,7
234	0,172	48,1	--	--	0,185	51,2	--	--
273	--	--	0,173	50,89	--	--	0,152	44,5
287	0,154	43,2	--	--	0,162	44,9	--	--
308	--	--	0,139	40,922	--	--	0,135	39,3
343	0,126	35,3	--	--	0,146	40,4	--	--

Conc.: concentración; Ret.: Retención; EB: equivalente de betanina

Tabla 38. Retención (%) de betacianinas en el tiempo de almacenamiento a 45°C

Tiempo (días)	P-C		P-K		UF-C		UF-K	
	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)
0	0,357	100,0	0,389	100,0	0,359	100,0	0,350	100,0
7	0,309	86,3	0,363	93,4	0,321	89,5	0,328	93,7
14	0,340	95,0	0,351	93,3	0,348	97,0	0,336	95,9
21	0,328	91,8	0,353	90,7	0,301	83,9	0,294	86,6
28	0,293	82,1	0,334	85,9	0,289	80,4	0,289	82,5
35	0,284	79,6	0,314	80,7	0,280	78,1	0,274	78,1
42	0,263	73,7	0,302	77,7	0,264	73,5	0,257	73,5
56	0,238	66,7	0,277	71,3	0,242	67,4	0,241	69,0
70	0,221	61,7	0,262	67,4	0,221	61,5	0,223	63,7
87	0,207	57,8	0,250	64,2	0,204	56,7	0,208	59,5
112	0,179	50,1	0,231	59,3	0,188	52,3	0,186	53,0
140	0,147	41,1	0,189	48,6	0,159	44,3	0,152	43,5
168	0,117	32,8	0,157	40,3	0,128	35,8	0,134	38,3
196	0,100	28,1	0,125	32,1	0,110	30,7	0,119	33,9

Conc.: concentración; Ret.: Retención; EB: equivalente de betanina

Tabla 39. Retención (%) de betacianinas en el tiempo de almacenamiento a 60°C

Tiempo (días)	P-C		P-K		UF-C		UF-K	
	Conc. (mg EB/g)	Ret. (%)						
		100,						
0	0,36	0	0,34	100,0	0,36	100,0	0,34	100,0
7	0,34	95,3	0,30	93,0	0,34	93,8	0,29	92,5
14	0,33	90,7	0,31	96,3	0,33	87,0	0,29	94,4
21	0,30	83,0	0,31	96,3	0,31	87,0	0,28	92,2
28	0,28	77,0	0,37	93,0	0,30	81,9	0,30	85,6
35	0,25	72,3	--	--	0,29	79,8	--	--
42	0,24	69,1	0,32	93,2	0,27	75,8	0,28	81,1
56	0,20	54,9	--	--	0,23	64,2	--	--
63	--	--	0,30	89,1	--	--	0,27	77,8
70	--	--	0,27	79,1	--	--	0,25	73,0
77	0,20	56,3	0,25	73,9	0,22	62,6	0,23	67,2
84	--	--	0,23	67,1	--	--	0,26	77,1
91	0,19	54,0	--	--	0,22	60,8	--	--
98	--	--	0,27	78,3	--	--	0,22	65,2
105	0,17	49,9	--	--	0,20	55,1	--	--
112	--	--	0,20	59,0	--	--	0,21	61,0
126	--	--	0,18	52,3	--	--	0,17	50,7
133	0,14	37,8	--	--	0,16	43,8	--	--
140	--	--	0,16	47,7	--	--	0,13	37,1
154	--	--	0,13	37,0	--	--	0,09	25,1
161	0,09	24,4	--	--	0,13	36,8	--	--
189	0,06	18,1	--	--	0,09	24,2	--	--
196	--	--	0,07	19,4	--	--	0,06	17,1

Conc.: concentración; Ret.: Retención; EB: equivalente de betanina

Anexo 10

Retención (%) de betaxantinas en el tiempo de almacenamiento a 30, 45 y 60°C.

Tabla 40. Retención (%) de betaxantinas en el tiempo de almacenamiento a 30°C

Tiempo (días)	P-C		P-K		UF-C		UF-K	
	Conc. (mg IB/g)	Ret. (%)						
				100,0				100,
0	0,160	100,0	0,138	0	0,165	100,0	0,150	0
7	0,149	93,0	0,135	97,78	0,164	98,9	0,140	93,6
14	0,138	87,9	0,127	94,24	0,160	97,2	0,125	83,2
21	0,130	81,5	--	--	0,145	87,9	--	--
28	0,130	81,1	0,113	82,11	0,146	88,6	0,129	85,7
35	0,129	80,7	--	--	0,149	87,1	--	--
42	0,117	72,6	0,120	87,23	0,140	85,0	0,121	80,9
56	0,104	65,8	0,089	67,90	0,136	82,0	0,134	92,7
70	--	--	0,125	90,47	--	--	0,130	86,8
77	0,116	72,0	0,123	89,18	0,136	84,4	0,135	90,1
91	0,127	79,4	--	--	0,136	82,6	--	--
98	0,126	79,1	--	--	0,133	80,1	--	--
105	0,120	77,4	0,119	86,29	0,125	75,4	0,130	86,9
119	0,135	84,4	--	--	0,133	80,6	--	--
161	--	--	0,114	82,76	--	--	0,128	85,0
175	0,115	72,0	--	--	0,136	82,3	--	--
217	--	--	0,107	77,34	--	--	0,118	78,7
234	0,102	63,6	--	--	0,122	74,0	--	--
273	--	--	0,090	65,32	--	--	0,095	63,5
287	0,090	56,2	--	--	0,108	65,3	--	--
				60,52				
308	--	--	0,084	2	--	--	0,092	61,3
343	0,081	50,7	--	--	0,099	60,0	--	--

Conc.: concentración; Ret.: Retención; IB: equivalente de indicaxantina

Tabla .41. Retención (%) de betaxantinas en el tiempo de almacenamiento a 45°C

Tiempo (días)	P-C		P-K		UF-C		UF-K	
	Conc. (mg IB/g)	Ret. (%)						
0	0,139	100,0	0,134	100,0	0,146	100	0,139	100,0
7	0,119	86,0	0,140	104,4	0,136	93,0	0,133	95,7
14	0,136	97,9	0,137	98,3	0,133	91,0	0,139	99,9
21	0,132	95,3	0,131	96,5	0,131	89,8	0,132	96,8
28	0,125	90,3	0,125	93,6	0,132	90,0	0,131	93,8
35	0,124	89,1	0,128	91,7	0,132	90,3	0,127	91,4
42	0,122	87,9	0,124	92,5	0,130	88,5	0,126	90,5
56	0,119	85,8	0,122	91,5	0,130	88,9	0,123	88,4
70	0,115	82,8	0,126	94,5	0,123	84,2	0,121	86,7
87	0,113	81,5	0,123	91,9	0,119	81,6	0,119	85,7
112	0,108	77,6	0,118	88,1	0,116	79,5	0,110	78,9
140	0,089	63,9	0,100	75,0	0,099	67,6	0,100	71,6
168	0,078	56,5	0,089	66,3	0,087	59,3	0,092	65,8
196	0,070	50,2	0,083	59,6	0,075	51,6	0,082	58,8

Conc.: concentración; Ret.: Retención; IB: equivalente de indicaxantina

Tabla 42. Retención (%) de betaxantinas en el tiempo de almacenamiento a 60°C

Tiempo (días)	P-C		P-K		UF-C		UF-K	
	Conc. (mg IB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg IB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg IB/g)	Ret. (%)	Conc. (mg IB/g)	Ret. (%)
0	0,160	100,0	0,138	100,0	0,165	100,0	0,150	100,0
7	0,154	96,0	0,123	97,6	0,166	99,94	0,129	99,8
14	0,158	97,0	0,135	100,0	0,166	97,23	0,126	99,7
21	0,144	90,3	0,135	100,0	0,159	96,50	0,139	100,0
28	0,147	91,6	0,142	95,7	0,156	94,73	0,136	90,7
35	0,151	93,3	--	--	0,158	95,37	--	--
42	0,148	92,1	0,146	99,5	0,156	94,39	0,134	89,6
56	0,121	75,3	--	--	0,129	78,5	--	--
63	--	--	0,139	100,0	--	--	0,141	93,5
70	--	--	0,137	100,0	--	--	0,145	95,6
77	0,123	77,7	0,140	100,0	0,128	77,1	0,137	91,1
84	--	--	0,123	87,3	--	--	0,142	94,4
91	0,123	76,6	--	--	0,132	79,7	--	--
98	--	--	0,135	97,5	--	--	0,127	86,8
105	0,118	74,6	--	--	0,128	75,4	--	--
112	--	--	0,130	94,0	--	--	0,122	80,4
126	--	--	0,119	86,0	--	--	0,112	73,9
133	0,102	63,8	--	--	0,103	63,9	--	--
140	--	--	0,105	76,1	--	--	0,090	58,7
154	--	--	0,096	69,8	--	--	0,076	50,6
161	0,079	49,2	--	--	0,083	50,3	--	--
189	0,062	38,8	--	--	0,073	44,3	--	--
196	--	--	0,074	53,9	--	--	0,073	48,7

Conc.: concentración; Ret.: Retención; IB: equivalente de indicaxantina