



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**CINETICA DE DEGRADACION DE BETALAINAS EN MICROPARTICULAS DE
PULPA DE TUNA (*OPUNTIA FICUS-INDICA*), EXTRACTO ULTRAFILTRADO Y
NANOFILTRADO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS, MENCIÓN PRODUCCIÓN AGROINDUSTRIAL**

FRANCISCO JOSE CARMONA CALDERA

DIRECTORES DE TESIS

**PAZ ROBERT CANALES
CARMEN SAENZ HERNANDEZ**

PROFESORES CONSEJEROS

**HUGO NUÑEZ KALASIC
PAULA JIMENEZ PATIÑO**

**SANTIAGO - CHILE
2013**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**CINETICA DE DEGRADACION DE BETALAINAS EN MICROPARTICULAS DE
PULPA DE TUNA (*OPUNTIA FICUS-INDICA*), EXTRACTO ULTRAFILTRADO Y
NANOFILTRADO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS, MENCIÓN PRODUCCIÓN AGROINDUSTRIAL**

FRANCISCO JOSE CARMONA CALDERA

DIRECTORES DE TESIS

**PAZ ROBERT CANALES
CARMEN SAENZ HERNANDEZ**

PROFESORES CONSEJEROS

**HUGO NUÑEZ KALASIC
PAULA JIMENEZ PATIÑO**

**COLABORADORA
CRISTINA VERGARA**

**SANTIAGO - CHILE
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

CINETICA DE DEGRADACION DE BETALAINAS EN MICROPARTICULAS DE
PULPA DE TUNA (*OPUNTIA FICUS-INDICA*), EXTRACTO ULTRAFILTRADO Y
NANOFILTRADO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magister en
Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Agroindustrial

FRANCISCO JOSE CARMONA CALDERA

DIRECTORES DE TESIS

CALIFICACIONES

FIRMA

Paz Robert Canales
Químico, Dr.

Aprobada

Carmen Sáenz Hernández
Químico Farmacéutico, Dr.

Aprobada

PROFESORES CONSEJEROS

Hugo Núñez Kalasic
Ingeniero Agrónomo, M.Sc.

Aprobada

Paula Jimenez Patiño
Medico Veterinario, Dr.

Aprobada

Santiago, Chile
2013

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
El color en los alimentos	3
Compuestos Bioactivos	3
Estabilidad de las betalaínas	4
Isomerización	6
Desglicosilación	7
Hidrólisis	7
Descarboxilación	7
Deshidrogenación.....	7
Descarboxilaciones y deshidrogenaciones múltiples	8
Tecnología de membrana en la separación y concentración de betalaínas	8
Microencapsulación	10
Métodos de encapsulación	11
Materiales utilizados en la encapsulación.....	11
Hipótesis	13
Objetivos.....	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos.....	13
MATERIALES Y METODOS	14
Lugar de Trabajo.....	14
Materiales	14
Métodos	15
ETAPA 1. Obtención y caracterización de la pulpa de tuna (P) y caracterización del extracto ultrafiltrado (UF) y nanofiltrado (NF)	16
Obtención de la pulpa de tuna púrpura (P)	16
Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P), extracto UF y NF.....	16
Análisis estadístico	17

ETAPA 2. Elaboración y caracterización de las micropartículas de pulpa de tuna, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.	18
Elaboración de las micropartículas	18
Caracterización de las micropartículas	19
Análisis estadístico	21
ETAPA 3. Estudio de estabilidad de las micropartículas de pulpa de tuna, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.	22
Diseño y análisis estadístico	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Etapa 1. Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P), extracto ultrafiltrado (UF) y nanofiltrado (NF).	24
Etapa 2. Elaboración y caracterización de micropartículas.....	26
Morfología de las micropartículas	29
Etapa 3. Estudio de estabilidad de las micropartículas de pulpa de tuna, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.	33
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
ANEXOS	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones óptimas de elaboración de micropartículas de pulpa, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484.	18
Cuadro 2. Características físicas y químicas de la pulpa, extracto ultrafiltrado y extracto nanofiltrado.	24
Cuadro 3. Caracterización de las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K elaboradas bajo condiciones óptimas.	27
Cuadro 4. Parámetros de color de las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K elaboradas bajo condiciones óptimas establecidas previamente.	30
Cuadro 5. Constantes de velocidad de degradación (k_{obs}) de betacianinas para los sistemas de micropartículas a diferentes temperaturas.	38
Cuadro 6. Constantes de velocidad de degradación (k_{obs}) de betaxantinas para los sistemas de micropartículas a diferentes temperaturas.	38
Cuadro 7. Parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betacianinas para los sistemas de micropartículas estudiados	41
Cuadro 8. Parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betaxantinas para los sistemas de micropartículas estudiados	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de betacianinas (A) y betaxantinas (B)	4
Figura 2. Vías de degradación de betanina	6
Figura 3. Flujograma de la investigación.....	15
Figura 4. Microfotografías de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas: P-C (A), P-K (B), UF-C (C), UF-K (D), NF-C (E) y NF-K (F).....	32
Figura 5. Porcentaje de retención de betacianinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C), UF-K (D), NF-C (E) y NF-K (F) a \blacklozenge (30°C), \blacksquare (45°C) y \blacktriangle (60°C).....	34
Figura 6. Porcentaje de retención de betaxantinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C) y UF-K (D) \blacklozenge (30°C), \blacksquare (45°C) y \blacktriangle (60°C).....	35
Figura 7. Logaritmo natural del porcentaje de retención de betacianinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C), UF-K (D), NF-C (E) y NF-K (F) a \blacklozenge (30°C), \blacksquare (45°C) y \blacktriangle (60°C).....	36
Figura 8. Logaritmo natural del porcentaje de retención, de betaxantinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C) y UF-K (D), \blacklozenge (30°C), \blacksquare (45°C) y \blacktriangle (60°C).....	37
Figura 9. Línea isocinética para degradación de las betacianinas de los sistemas de micropartículas P-C, UF-C, P-K, UF-K, NF-K y NF-C.....	43
Figura 10. Línea isocinética para degradación de las betaxantinas de los sistemas de micropartículas P-C, UF-C, P-K, UF-K, NF-K y NF-C.....	43
Figura 11. Curva de calibración de glucosa	52
Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico.....	54
Figura 13. Carta de color	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo I. Método espectrofotométrico de reacción de antrona	51
Anexo II. Método de determinación de polifenoles totales	53
Anexo III. Determinación del contenido de betalaínas por espectrofotometría	55
Anexo IV. Método para determinar betalaínas totales y superficiales en micropartículas.....	57
Anexo V. Método para determinar la capacidad antioxidante radical oxígeno (ORAC)	58
Anexo VI. Carta de representación del color.....	61

RESUMEN

La tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*), es una importante fuente natural de compuestos bioactivos, destacándose las betalaínas (betacianinas y betaxantinas) y polifenoles, que representan una alternativa para el desarrollo de ingredientes funcionales debido a sus características colorantes y antioxidantes. El objetivo de esta investigación fue determinar la estabilidad de las betalaínas en micropartículas de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*), extracto ultrafiltrado (UF) y nanofiltrado (NF), estudiando su cinética de degradación.

Las micropartículas se prepararon por secado por atomización, utilizando Capsul (C) y K-4484 (K), como agentes encapsulantes. Las micropartículas de los seis sistemas (P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K) se almacenaron a tres temperaturas (30, 45 y 60 °C). Se determinaron las constantes de degradación de betacianinas y betaxantinas y parámetros termodinámicos. La degradación siguió una cinética de primer orden para todos los sistemas de micropartículas estudiados. Las constantes de velocidad de degradación para las betacianinas estuvieron entre $1,8 - 12,1 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$ para 30°C, entre $3,2 - 14,2 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$ para 45°C y entre $5,8 - 30,4 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$ para 60°C. Para las betaxantinas se obtuvieron constantes de degradación entre $1,3 - 2,1 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$ para 30°C, entre $1,8 - 3,1 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$ para 45°C y entre $2,5 - 4,3 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$ para 60°C.

No se observaron diferencias significativas en la energía de activación (E_a), entalpía de activación (ΔH^\ddagger) y entropía de activación (ΔS^\ddagger) para betacianinas entre los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K y NF-C. Por otro lado, el cambio de energía de activación de betacianina para el sistema NF-K fue significativamente mayor con respecto a los otros sistemas estudiados, lo cual fue concordante con la menor constante de velocidad de degradación.

Se obtuvo una relación lineal en el gráfico de ΔH^\ddagger vs ΔS^\ddagger , éste efecto sugiere que tanto las betacianinas como las betaxantinas se degradaron por un mecanismo similar.

Las micropartículas obtenidas en este estudio, podrían ser utilizadas en la industria de alimentos por sus propiedades colorantes y antioxidantes.

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

SUMMARY

Purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*), is an important source of bioactive compounds, mainly betalains (betacyanins and betaxanthins) and polyphenols, which represent an alternative for new functional ingredients with colorant and antioxidant properties. The objective of this investigation was to determine the stability of betalains from purple cactus pear pulp (*Opuntia ficus-indica*), ultrafiltrated (UF) and nanofiltrated (NF) extracts microparticles, studying their kinetics degradation.

Microparticles were obtained by spray-drying using Capsul (C) and K-4484 (K) as encapsulating agents. The microparticles (P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C and NF-K), were stored at three temperatures (30, 45 and 60 °C). Degradation rate constants of betacyanins and betaxanthins and thermodynamic parameters were determined. The betacyanin and betaxanthin degradation followed first order kinetics for all studied microparticles systems. Betacyanins degradation constants were between $1,8 - 12,1 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$ for 30°C, between $3,2 - 14,2 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$ for 45°C and between $5,8 - 30,4 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$ for 60°C. The degradation constants for betaxanthins were between $1,3 - 2,1 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$ for 30°C, between $1,8 - 3,1 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$ for 45°C and between $2,5 - 4,3 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$ for 60°C.

No significant differences were observed in the activation energy (E_a), activation enthalpy (ΔH^\ddagger) and activation entropy (ΔS^\ddagger) for betacyanins among P-C, P-K, UF-C, UF-K and NF-C systems. Furthermore, the activation energy change for betacyanin in the NF-K system was significantly higher regard to the other systems, in accordance with the lower degradation constant.

A linear relationship was obtained between ΔH^\ddagger and ΔS^\ddagger , suggesting that both, betaxanthins and betacyanins, are degraded by a similar mechanism.

Microparticles obtained in this study could be used in food industry for their colorant and antioxidant properties.

Keywords: Microparticles, natural pigments, betalains stability.

INTRODUCCIÓN

El color en los alimentos

El color es uno de los principales atributos sensoriales de los alimentos y con frecuencia determina la aceptabilidad y elección del producto, dado que se utiliza como indicador de calidad y frescura. En la actualidad existe una tendencia por parte de los consumidores a preferir alimentos formulados con colorantes naturales, por considerarlos menos dañinos que los artificiales e incluso saludables (Azeredo, 2008).

Tradicionalmente la principal fuente natural de pigmentos de color rojo, ha sido la raíz de la betarraga púrpura (*Beta vulgaris*) por su alto contenido de betanina. Sin embargo, ésta posee otros compuestos, que aportan sabores desagradables al alimento (Obón, 2009). En este contexto, la tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) es una fuente alternativa de betalaínas (Stintzing y Carle, 2004) para ser utilizada como pigmento natural de color rojo.

Compuestos Bioactivos

Los compuestos bioactivos (fitoquímicos) son sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida (a corto plazo), pero tienen efectos positivos en la salud. En el caso de los ecotipos de tunas de colores, se destacan los pigmentos como las betalaínas, carotenoides y compuestos fenólicos a los cuales se les ha atribuido actividad antioxidante (Stintzing y Carle, 2004). Además, están presentes fibra, hidrocoloides (mucílago), ácido ascórbico y minerales (calcio, fósforo y potasio) (Sáenz y Sepúlveda, 2001; Sáenz, 2006).

Las betalaínas son un grupo de 70 pigmentos hidrosolubles. Sus estructuras químicas son sintetizadas a partir del ácido betalámico y puede dar origen a dos grupos estructurales: las betacianinas (rojo-púrpura) en caso que la conjugación sea con 3,4-dihidroxifenilalanina (Figura 1 A) y las betaxantinas (amarillo-anaranjado) donde la conjugación puede ocurrir con aminoácidos o aminas (Figura 1 B) (Azeredo, 2008).

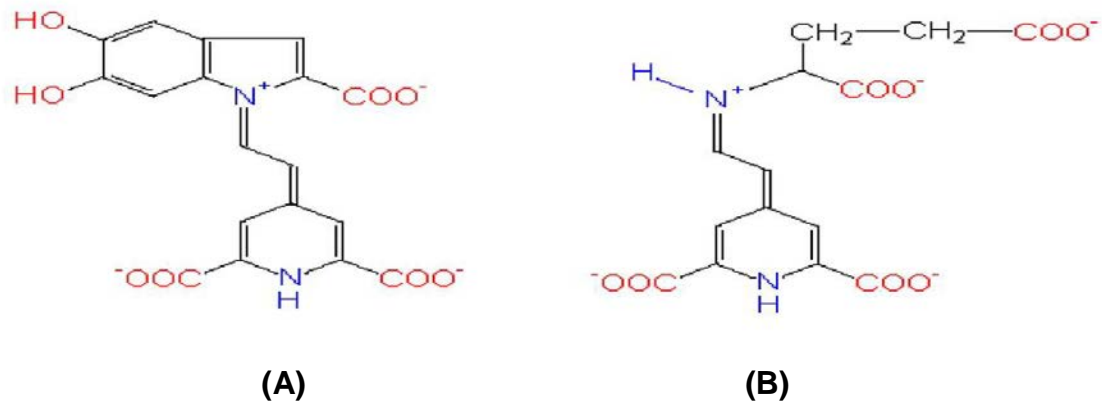


Figura 1. Estructura de betacianinas (A) y betaxantinas (B) (García, 2008).

Estabilidad de las betalaínas

La estabilidad de las betalaínas, se ve afectada principalmente por condiciones del medio-ambiente como: luz, O_2 , a_w , pH y temperatura, siendo estos dos últimos los principales factores que afectan su estabilidad (Azeredo, 2008).

Las betalaínas son capaces de absorber luz tanto UV como visible, produciendo el paso de los electrones a un nivel de energía superior, que otorga una mayor reactividad a las betalaínas debido a la disminución de la energía de activación, por lo que se puede establecer una relación inversamente proporcional entre la estabilidad de estos pigmentos y la cantidad de luz a la cual son expuestos. El efecto degradativo de la luz sobre las betalaínas se encuentra estrechamente

relacionado con la concentración de O₂ presente en el medio (Herbach *et al.*, 2006).

La estabilidad de las betalaínas es inversamente proporcional a la concentración de O₂. Se ha podido observar que tanto la betanidina como la betanina son inestables en presencia de oxígeno, sin embargo, la capacidad de este para interactuar con los pigmentos está determinada principalmente por el pH del medio. Cuando el pH se encuentra fuera del rango óptimo de estabilidad (4-6), ocurre la mayor interacción con el O₂ (Herbach *et al.*, 2006).

La a_w afecta directamente la estabilidad de las betalaínas, dado que valores altos de este parámetro parecieran favorecer la ruptura hidrolítica del enlace aldimina de la molécula (Herbach *et al.*, 2006). La estabilidad aumenta con valores bajos de a_w, observándose que a valores inferiores a 0,63, la betanina presenta una mayor estabilidad, este comportamiento puede ser explicado por una movilidad reducida de reactantes o también por reducción del oxígeno soluble en agua (Azeredo, 2008).

Las betalaínas son estables en un rango de pH entre 3 y 7. Se ha observado que en un medio alcalino las betalaínas son más susceptibles a la ruptura hidrolítica del enlace aldimina, por el contrario, en condiciones de acidéz se induce una recondensación de ácido betalámico con el grupo amino (betaxantinas) o con el ciclo-Dopa-5-O-β-glucósido (betacianinas). En el caso particular de las betaninas se ha observado que su rango óptimo de pH se encuentra entre 4 y 6 (Herbach *et al.*, 2006).

Existe una relación directa entre el aumento de la temperatura y la velocidad de degradación de las betalaínas. Los tratamientos térmicos a soluciones de betanina, producen degradación por isomerización, descaboxilación o ruptura

hidrolítica, que a nivel molecular resulta en una diversa gama de compuestos de degradación, lo que trae como consecuencia una reducción del color rojo de la solución (Herbach *et al.*, 2006).

En la Figura. 2 se presentan las vías de degradación de la betanina

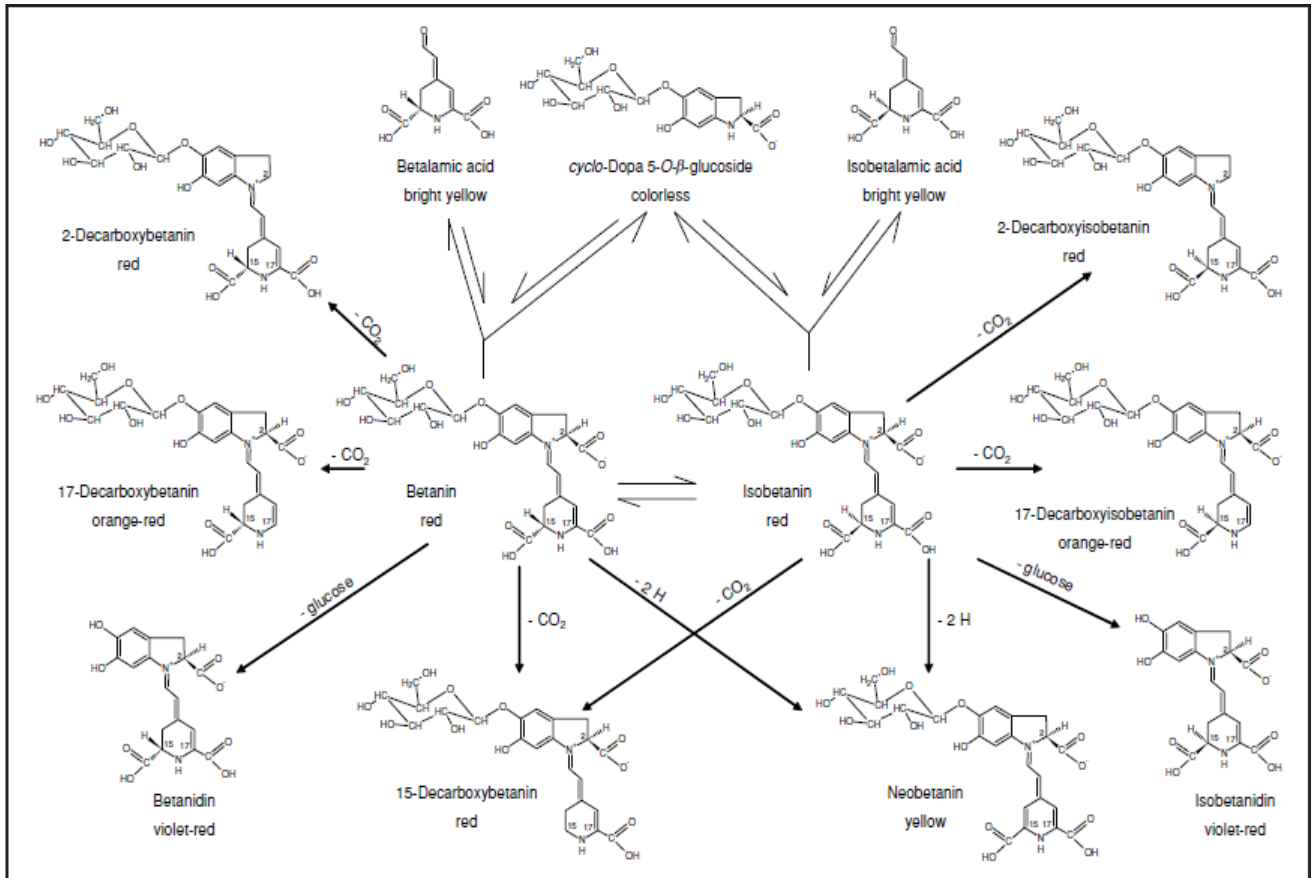


Figura 2. Vías de degradación de betanina (Herbach *et al.*, 2006).

Tanto los cambios de color como los de absorbancia se explican por las diferentes reacciones, que constituyen las vías de degradación de las betacianinas. Entre estas se encuentran:

Isomerización

La betanina está acompañada frecuentemente por su respectiva isobetanina; la proporción en la que se encuentran ambas depende principalmente de su fuente de obtención. Es así como la isomerización del C-15 de la betanina, se considera más una modificación estructural que una reacción de degradación. En el caso de

la isobetanina, esta posee propiedades cromáticas idénticas a la de la betanina y por tanto no se observa una diferencia de color entre ambos compuestos.

Desglicosilación

Esta reacción ocurre en condiciones de alta acidez, alta temperatura y en presencia de la enzima β -glucosidasa. La pérdida de la molécula de glucosa, causa que la absorbancia máxima de la betanina (538 nm) se vea modificada en 4 nm. La estabilidad de la forma aglicona es menor a la que posee la molécula glicosilada, produciendo un aumento de la susceptibilidad a la oxidación.

Hidrólisis

La escisión hidrolítica del enlace aldimina en las betalaínas se puede observar tanto a valores de pH mayores a 6, como después de un tratamiento térmico. La escisión de la betanina (Fig. 2), da como resultado ácido betalámico (amarillo brillante) y ciclo-Dopa 5-O- β -glucósido (inoloro), disminuyendo la capacidad colorante, sin embargo, esta reacción puede ser revertida mediante una recondensación del ácido betalámico con el ciclo-Dopa 5-O- β -glucósido, dando como resultado la betanina original (Herbach *et al.*, 2006).

Descarboxilación

La descarboxilación puede ocurrir en betacianinas (en los carbonos C₂, C₁₅ y C₁₇) y betaxantinas (en los carbonos C₁₁ y C₁₃). La escisión de un grupo carboxílico en una molécula de betanidina, betanina o indicaxantina, induce una disminución en la absorbancia máxima que presentan los compuestos originales.

Deshidrogenación

La deshidrogenación se debe a la pérdida de dos átomos de hidrógeno desde betanina o isobetanina, lo que genera un doble enlace en estos compuestos dando como resultado una molécula de neobetanina. A pesar de que la estructura de la neobetanina es similar a la betanina, esta se caracteriza por tener un color amarillo (λ_{\max} 470 nm). Las altas temperaturas favorecen la formación de este

compuesto siendo también el principal responsable de los cambios de color en soluciones de betarraga (Herbach *et al.*, 2006).

Descarboxilaciones y deshidrogenaciones múltiples

Se ha observado que los tratamientos térmicos prolongados pueden dar origen a una gran variedad de compuestos de degradación, los cuales son resultado directo de descarboxilaciones múltiples o de una combinación de descarboxilación con deshidrogenación. Esto explicaría la formación de neobetanina bidescarboxilada durante la aplicación de tratamientos térmicos prolongados a soluciones de betanina (Herbach *et al.*, 2006).

Las betalaínas se extraen habitualmente con solvente, con o sin aplicación de temperatura, con o sin tratamiento enzimático (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Una alternativa es la aplicación de tecnología de membranas, que utiliza bajas temperaturas.

Tecnología de membrana en la separación y concentración de betalaínas

La aplicación de la tecnología de membranas es ideal para trabajar con pigmentos como las betalaínas, ya que tiene una serie de ventajas, entre ellas está la capacidad de separar o concentrar compuestos bioactivos presentes en la pulpa de tuna, sin la necesidad de aumentar la temperatura y por tanto sin inducir una degradación del pigmento (Cassano *et al.*, 2010).

Una membrana se puede definir como una superficie que permite el paso selectivo de sustancias a través de ella. El flujo de estas sustancias está determinado por diferentes "fuerzas impulsoras", entre las que se pueden encontrar: la presión, la concentración y el potencial eléctrico. La selectividad permitirá enriquecer o empobrecer un flujo en una o varias sustancias. Del flujo de alimentación a la membrana emergen dos flujos: el retenido, que contendrá las sustancias que no han logrado pasar a través de la membrana y el permeado en el que se

encontrarán las sustancias que sí pudieron pasar a través de ella (Raventós, 2005).

La selectividad de una membrana frente a una sustancia, puede estar dada por dos factores; primero por el tamaño de los poros de la membrana, dado que las sustancias de mayor tamaño que los poros no podrán pasar a través de ella y segundo, por la afinidad química existente entre la membrana y la sustancia en cuestión (Raventós, 2005).

Los procesos de separación tradicional en la industria de alimentos son la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y la osmosis reversa (OR). Estos procesos presentan un mecanismo de selectividad ligado al tamaño molecular de las especies en solución. Las membranas se confeccionan a partir de polímeros predominantemente hidrofílicos y sus principales aplicaciones se encuentran en la clarificación de jugos de fruta, recuperación de proteína del suero lácteo, así como en el fraccionamiento y purificación de polisacáridos (Guizard, 1999).

La MF, opera a presiones de 20 a 200 kPa, con un corte de masa molecular de entre 0,05 a 5 μm . Este proceso permite remover partículas, bacterias y coloides (como los mucilagos) del permeado. Se utiliza de manera frecuente para el tratamiento de aguas y como pre tratamiento para otros procesos de filtración (como la UF y NF). Se ha observado que la MF permite clarificar la pulpa de tuna amarilla mediante la remoción de los sólidos suspendidos en ella (Cassano *et al.*, 2010).

La UF es un proceso de filtración por membrana que opera a bajas presiones (35 a 1000 kPa), con un corte de masa molecular entre 1-500 kDa. Moléculas pequeñas como azúcares, sales, aminoácidos pueden pasar a través de la membrana, mientras que las más grandes quedan retenidas. En alimentos la

ultrafiltración se ha utilizado de manera satisfactoria para la concentración, fraccionamiento y despectinización de jugos de frutas (Cassano *et al.*, 2010).

En la NF, las membranas retienen moléculas de soluto de peso molecular entre 0,1 y 1 kDa y utiliza presiones entre 700-3500 kPa (Raventós, 2005). La NF de una solución de *Hibiscus sabdariffa*, ha demostrado una mayor capacidad de concentración de antocianinas que la UF, a un flujo de permeado y presión transmembrana similares (Cissé *et al.*, 2011).

Es importante poder estabilizar y proteger a las betalaínas de las condiciones ambientales que puedan inducir su degradación, este objetivo se puede alcanzar utilizando la tecnología de encapsulación (Desai y Park, 2005).

Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual sustancias activas sólidas, líquidas ó gaseosa se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los activos del ambiente y de influencias que puedan resultar deletéreas como por ejemplo, oxígeno, luz, agua, mejorando así su estabilidad, o bien para liberar en forma gradual los compuestos activos (Ré, 1998). En general, una micropartícula posee una estructura compuesta por dos elementos; el material encapsulado (material del núcleo o fase interna) y el agente encapsulante (Gibbs *et al.*, 1999). El tamaño y forma de las micropartículas dependen del agente encapsulante y del método de encapsulación utilizado (Desai y Park, 2005).

La elección del material utilizado como agente encapsulante, dependerá tanto de la funcionalidad que se desee dar al producto final como de algunas restricciones prácticas, como por ejemplo: agente activo utilizado, tipo de liberación, costos y requerimientos de estabilidad (Nedovic *et al.*, 2011).

Métodos de encapsulación

En la actualidad existen diversos métodos para la elaboración de micropartículas, los cuales se pueden dividir en tres grupos (Kumar, 2006).

- Procesos físicos: Secado por aspersión, extrusión, lecho fluidizado, centrifugación y aspersión por enfriamiento.
- Procesos químicos: Polimerización interfacial e inclusión molecular.
- Procesos fisicoquímicos: Coacervación, atrapamiento en liposomas, encapsulación asistida por CO₂ y gelificación iónica.

El secado por aspersión, es uno de los métodos más utilizados para la elaboración de micropartículas, dado que es un proceso económico y permite utilizar diversos agentes encapsulantes. Además, este sistema es muy conveniente para trabajar con materiales sensibles al calor, como las betalaínas, porque que el tiempo de exposición a altas temperaturas es muy corto (5 -30 s) (Gouin, 2003).

De manera general el proceso consiste en atomizar el material que se encuentra en estado líquido (solución, dispersión o emulsión), en forma de finas gotas sobre una corriente de aire caliente. Cuando las pequeñas gotas del líquido se ponen en contacto con aire a mayor temperatura, se produce una rápida evaporación del solvente, de esta manera el agente encapsulante forma una matriz dentro de la cual queda el compuesto encapsulado, formando partículas que pueden tener una forma esférica o amorfa, con tamaños entre 10 µm y 100 µm (Gharsallaoui, 2007).

Materiales utilizados en la encapsulación

En los alimentos son pocos los polímeros que pueden utilizarse como agentes encapsulantes, dado que las normas para los aditivos alimentarios son más rígidas que para los productos farmacéuticos (Nedovic *et al.*, 2011).

La mayoría de los materiales utilizados para la encapsulación en el área de los alimentos, son biopolímeros, dentro de los que se encuentran los polisacáridos como: almidón y sus derivados, exudados de plantas (goma arábica, xantatana, mezquita) y extractos marinos (como el quitosano). Las proteínas y lípidos también han mostrado ser apropiados para su uso como agentes encapsulantes (Goud *et al.*, 2005).

Los agentes encapsulantes que se utilizarán en esta investigación serán Capsul[®] y K-4484. Capsul[®] es un almidón modificado hidrofólicamente, derivado del maíz ceroso que se presenta como un polvo fino blanquecino. Está diseñado para la encapsulación de compuestos bioactivos como aceites volátiles, vitaminas y extractos de hierbas. Es soluble en agua a temperaturas cercanas a 70°C, presenta muy baja viscosidad y su pH varía entre 3 y 4 (National Starch & Chemical, 2001a).

El K-4484 es una dextrina refinada a partir de almidón de tapioca y se presenta como un polvo fino blanquecino. Presenta propiedades reológicas que lo hacen adecuado como fuente de hidratos de carbono para todo tipo de sistemas alimentarios líquidos, pero también en aplicaciones para el recubrimiento y formación de películas. El K-4484 presenta una buena solubilidad a bajas temperaturas (National Starch & Chemical, 2001b).

Hipótesis

Las betalaínas de micropartículas de extracto ultrafiltrado (UF) y extracto nanofiltrado (NF), presentarán una velocidad de degradación menor con respecto a las betalaínas de micropartículas de pulpa de tuna púrpura.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la estabilidad de las betalaínas en micropartículas de pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) y de extractos UF y NF, estudiando la cinética de degradación.

Objetivos específicos

- Caracterizar la pulpa de tuna púrpura, extracto UF y NF, mediante análisis físicos y químicos.
- Elaborar y caracterizar micropartículas de pulpa de tuna púrpura, extracto UF y NF obtenidas mediante secado por atomización, utilizando como agentes encapsulantes Capsul[®] y K-4484.
- Estudiar la estabilidad de las betalaínas en micropartículas de pulpa de tuna púrpura, extracto UF y NF, almacenadas a tres temperaturas (30, 45 y 60°C).

MATERIALES Y METODOS

Lugar de Trabajo

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

Materiales

- Pulpa (P) de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) de la cosecha 2011 (Jardín de Variedades de la Estación Experimental Antumapu de la Universidad de Chile, ubicado en la ciudad de Santiago, Latitud -33° 34' 10.24", Longitud -70° 38' 6.22").
- Extracto ultrafiltrado (UF) se obtuvo utilizando una membrana cerámica, multitubular de 7 canales, con tamaño de poro 1 kDa, área de filtración de 0,013 m² y una presión transmembrana de 8 bar a 31°C. Se utilizó como alimentación el permeado de un proceso de microfiltración previo.
- Extracto nanofiltrado (NF) se obtuvo utilizando una membrana polimérica NF99HF (Alfa Laval) a una presión transmembrana de 25 bar a 15°C. Se utilizó como alimentación el permeado de un proceso de microfiltración previo.
- Agentes encapsulantes: Capsul[®] (almidón modificado de maíz) y K-4484 (dextrina de tapioca), obtenidos de National Starch.

Métodos

La metodología para este proyecto se dividió en 3 etapas (Fig. 3)

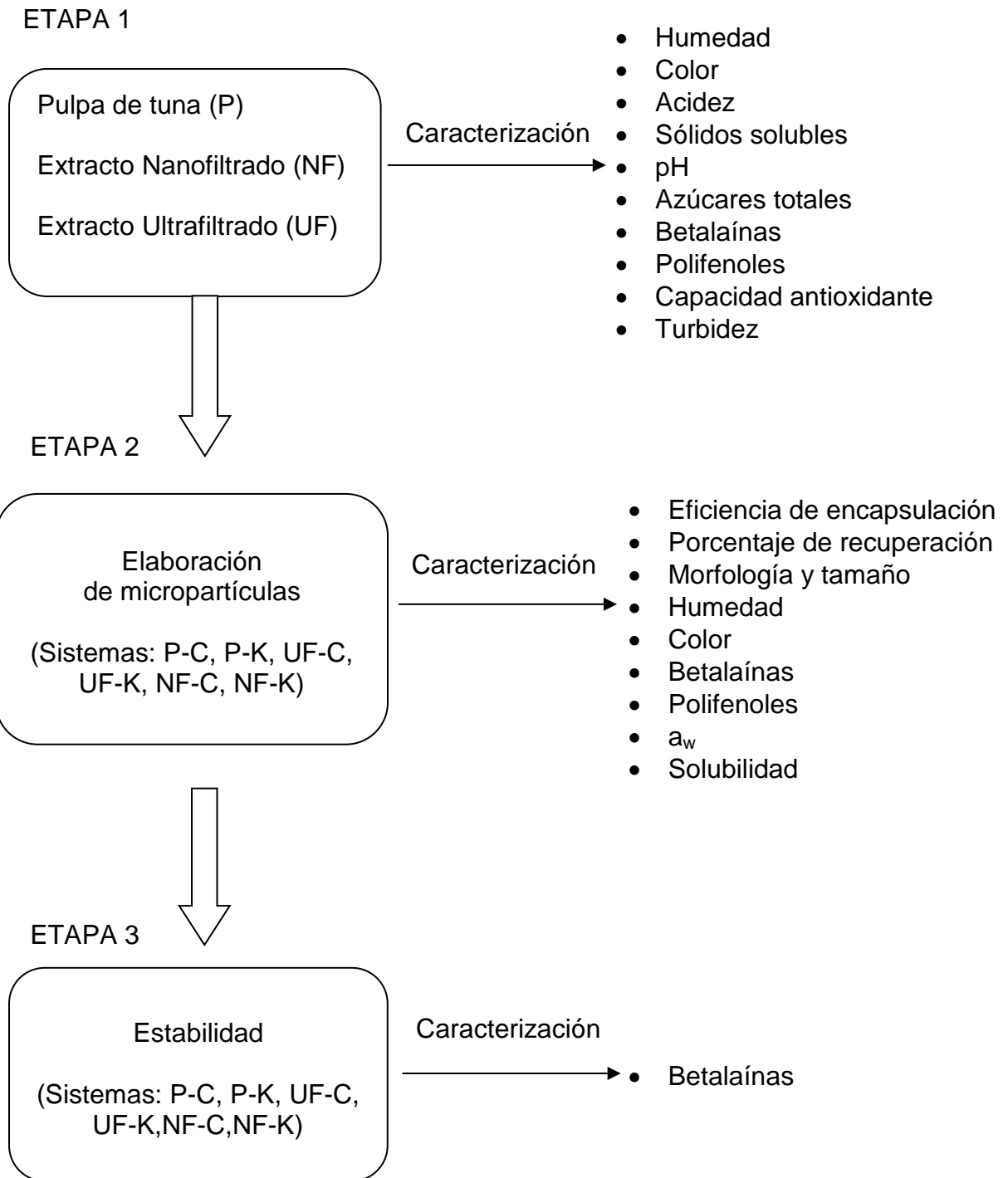


Figura 3. Flujograma de la investigación

ETAPA 1. Obtención y caracterización de la pulpa de tuna (P) y caracterización del extracto ultrafiltrado (UF) y nanofiltrado (NF).

Obtención de la pulpa de tuna púrpura (P)

Para la obtención de la pulpa, se eliminaron las espinas de las tunas, luego se lavaron, escobillaron, pelaron y tamizaron en una pulpadora de tornillo sin fin, provista de un tamiz de 2 mm (Alexanderwerk). La pulpa extraída se pesó y almacenó en bolsas de polipropileno de 500 g y se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización.

Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P), extracto UF y NF

La pulpa y los extractos se caracterizaron según los siguientes análisis:

- **Contenido de humedad, sólidos solubles (°Brix), pH y acidez:** de acuerdo al método descrito en AOAC (1996).
- **Contenido de azúcares totales:** Se determinó mediante espectrofotometría por el método de Antrona (Osborne y Voogt, 1986), utilizando un espectrofotómetro Optizen POP Mecasys (Corea del Sur), midiendo a una longitud de onda de 620 nm (Anexo I).
- **Parámetros de color (L, a*, b*, C* y Hab):** Se determinó mediante espectrofotometría, utilizando un colorímetro HunterLab modelo UltraScan Pro (USA). Previamente la pulpa se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm en una centrifuga modelo 5804 R Eppendorf AG (España), para separar las partículas en suspensión. Los extractos UF y NF se utilizaron sin tratamiento previo.

- **Contenido de betacianinas y betaxantinas totales:** Se determinaron mediante espectrofotometría, de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.* (2005), utilizando un espectrofotómetro Optizen POP Mecasys, midiendo a una longitud de onda de 480 nm para betaxantinas y 538 nm para betacianinas (Anexo III).
- **Contenido de polifenoles totales:** mediante espectrofotometría de acuerdo al método de Folin Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) utilizando un espectrofotómetro Optizen POP Mecasys (Corea del Sur), a una longitud de onda de 765 nm (Anexo II).
- **Capacidad antioxidante:** mediante ORAC de acuerdo al método descrito por Dávalos *et al.* (2004) (Anexo V).
- **Turbidez:** La turbidez se determinó usando un turbidímetro Hanna Modelo HI 93703 (USA).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos (P, UF y NF) y tres repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada uno de los parámetros medidos, cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas se aplicó el test de Tuckey (la unidad experimental para esta etapa correspondió a 1000 g de P, UF y NF).

ETAPA 2. Elaboración y caracterización de las micropartículas de pulpa de tuna, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.

Elaboración de las micropartículas

Las micropartículas de pulpa de tuna púrpura, extracto UF y NF se obtuvieron mediante secado por atomización utilizando un secador Büchi B-290 (Suiza), utilizando Capsul y K-4484 como agentes encapsulantes (P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K). Las micropartículas se elaboraron de acuerdo a las condiciones óptimas (Vergara, 2013) descritas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones óptimas de elaboración de micropartículas de pulpa, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484.

Sistema	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	Extracto (%)	AE (%)	Relación extracto/AE
P-C	133	30	10	3:1
P-K	110	30	10	3:1
UF-C	133	30	12	2,5:1
UF-K	110	30	30	1:1
NF-C	135	30	6	5:1
NF-K	110	30	10	3:1

P-C: pulpa-Capsul, P-K: pulpa-K4484, UF-C: ultrafiltrado-Capsul, UF-K: ultrafiltrado-K4484, NF-C: nanofiltrado-Capsul y NF-K: nanofiltrado-K4484, AE: agente encapsulante.

Los agentes encapsulantes (6-30 %), se disolvieron en agua destilada con agitación constante y temperatura para facilitar su disolución (sobre 82°C para Capsul y sobre 70°C, para K4484). Luego, la solución se enfrió hasta 30°C y se agregó el extracto de betalaínas (pulpa, extracto ultrafiltrado o nanofiltrado) (30%), finalmente la mezcla se homogeneizó por 2 minutos (Polytron PT 2100) a 11.000 rpm.

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

Caracterización de las micropartículas

Las micropartículas (P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K) obtenidas bajo condiciones óptimas se caracterizaron de acuerdo a los siguientes análisis:

- **Parámetros de color (L, a*, b*, C* y Hab):** Se determinó mediante espectrofotometría, utilizando un colorímetro HunterLab modelo UltraScan Pro (USA).
- **Contenido de polifenoles totales:** mediante espectrofotometría de acuerdo al método de Folin Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) utilizando un espectrofotómetro Optizen POP Mecasys (Corea del Sur), a una longitud de onda de 765 nm (Anexo II).
- **Solubilidad:** Se determinó de acuerdo al método descrito por Cano-Chauca *et al.* (2005). Las micropartículas (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.
- **Actividad de agua (a_w):** La actividad de agua se determinó utilizando un equipo Rotronic, modelo Hygrolab 2.
- **Eficiencia de encapsulación (EE):** Para calcular la eficiencia de encapsulación se determinaron las betacianinas y betaxantinas

superficiales y totales. Para ambos ensayos se utilizó un espectrofotómetro UNICAM UV/vis modelo UV 3 (USA), acoplado a un computador.

- **Betacianinas y betaxantinas superficiales:** Se extrajeron las betalaínas superficiales con una solución de etanol:metanol (1:1 v/v) y se cuantificaron por espectrofotometría (Stintzing *et al.*, 2005) (Anexo IV).
- **Betacianinas y betaxantinas totales:** Se determinaron destruyendo completamente las micropartículas. Primero se realizó una extracción con etanol:ácido acético:agua (50:8:42 v/v/v), luego se sonicó utilizando un sonicador Ultrasonic FS30H durante 50 minutos (intervalos de 20 minutos con 10 de descanso) y finalmente las betaciannas y betaxantinas totales se cuantificaron por espectrofotometría de acuerdo al método descrito por Stintzing *et al.* (2005) (Anexo IV).

La eficiencia de encapsulación se calculó de acuerdo a la Ecuación 1.

ETAPA 3. Estudio de estabilidad de las micropartículas de pulpa de tuna, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.

Las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K, se almacenaron a 30, 45 y 60°C en una estufa de aire forzado (Mermert modelo UFE 500, Alemania) con control de temperatura y en oscuridad. Se tomaron muestras para cada sistema de micropartículas a intervalos específicos para obtener un total de 6 a 8 puntos en cada sistema y temperatura estudiado. El contenido de betalaínas se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Stintzing *et al.* (2005).

El orden de degradación se obtuvo, por ajuste del coeficiente de correlación, para cinéticas de primer orden y la constante de degradación (k) se calculó de la pendiente el gráfico de $\ln(\%$ de retención) vs. tiempo. La energía de activación (E_a) y factor de frecuencia (A) se determinaron a través del modelo de Arrhenius (Ecuación 4).

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. $(1/T)$, basada en la teoría del estado de transición (Ecuación 5) (Robert *et al.*, 2003).

Diseño y análisis estadístico

Los ensayos de estabilidad, se realizaron por triplicado. Se empleó regresión lineal para determinar el orden y las constantes de velocidad de degradación de los 6 sistemas estudiados. Para determinar diferencias entre las constantes de velocidad, energía de activación, entalpía de activación y entropía de activación de los 6 tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas se aplicó el test de comparaciones múltiples de Tukey.

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 DISCUSIÓN

A continuación se presentan y discuten los resultados de acuerdo a las etapas planteadas.

Etapa 1. Caracterización de la pulpa de tuna púrpura (P), extracto ultrafiltrado (UF) y nanofiltrado (NF).

Los resultados de las caracterizaciones físicas y químicas de P, UF y NF se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características físicas y químicas de la pulpa, extracto ultrafiltrado y extracto nanofiltrado.

Parámetro	P	UF	NF
Sólidos solubles (°Brix) a 20 °C	14,0 ± 0,1 a	8,1 ± 0,0 c	13,6 ± 0,0 b
Azúcares totales (%)	13,2 ± 0,0 b	9,2 ± 0,3 c	17,5 ± 0,1 a
Humedad (%)	86,1 ± 0,2 c	91,9 ± 0,5 a	87,6 ± 0,21 b
pH	6,3 ± 0,1 a	5,6 ± 0,1 b	4,70 ± 0,01 c
Acidez (% ácido cítrico)	0,04 ± 0,00 b	0,15 ± 0,00 a	0,03 ± 0,00 c
Turbidez (NTU)	2453 ± 64 a	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b
Betacianinas (mg EB ¹ /L)	254,0 ± 0,2 a	247,9 ± 4,3 a	216,3 ± 7,0 b
Betaxantinas (mg EI ² /L)	85,4 ± 0,1 b	88,6 ± 1,2 a	79,1 ± 2,6 c
Polifenoles Totales (mg EAG ³ /L)	534,8 ± 4,4 b	659,7 ± 5,0 a	673,5 ± 13,5 a
L	12,5 ± 0,9 c	17,8 ± 0,1 b	19,3 ± 0,03 a
a*	43,2 ± 1,2 c	51,2 ± 0,1 b	53,3 ± 0,06 a
b*	21,0 ± 1,5 c	29,9 ± 0,01 b	32,4 ± 0,1 a
C*	48,0 ± 1,7 c	59,3 ± 0,1 b	62,4 ± 0,1 a
Hab	25,9 ± 1,0 c	30,3 ± 0,1 b	31,4 ± 0,1 a
Cambio de color (ΔE)	-----	13,08	16,67
ORAC (μmol Trolox/L)	7790 ± 170 a	3896 ± 86 b	2331 ± 100 c

¹ EB: expresado como Betanina; ² EI: expresado como Indicaxantina ³ EAG: equivalente de ácido gálico. Letras diferentes entre columnas, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey (p<0,05).

Los resultados de los parámetros medidos en la pulpa, se encuentran dentro del rango informado por otros autores para frutos de color púrpura de la especie *Opuntia ficus-indica* (Castellar *et al.*, 2003; Stintzing *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2008; Sáenz *et al.*, 2009). El contenido de betacianinas y betaxantinas, alcanzó valores de 254,0 mg EB/L y 85,4 mg EI/L, respectivamente. Estos resultados, fueron menores a los obtenidos por Stintzing *et al.* (2005) (431,0 mg EB/L y 195,8 mg EI/L) y por Sáenz *et al.* (2009) tanto para betacianinas (280,9 mg EB/L) como para betaxantinas (99,6 mg EI/L), pero significativamente mayores a los reportados por Morales *et al.* (2008) (111,0 mg EB/L y 29,3 mg EI/L). El contenido de polifenoles totales en la pulpa, presentó un valor de 534,8 mg EAG/L, inferior a lo obtenido por Stintzing *et al.* (2005) (660 mg EAG/L), Morales (2007) (777,4 mg/L EAG/L) y Sáenz *et al.* (2009) (909,5 mg EAG/L). Las diferencias presentes en los resultados pueden ser explicadas por factores, como el cultivar o variedad, madurez, clima, método de obtención y procedencia (Stintzing *et al.*, 2005; Stintzing y Carle, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2003; Sáenz, 2001).

Los extractos UF y NF fueron soluciones totalmente clarificadas (0 NTU), que a diferencia de P (2453 NTU), no contienen mucilagos. El extracto UF presentó un contenido de sólidos solubles (8,1 °Brix) y azúcares totales (9,2%) significativamente menores, respecto a P y NF. Por otro lado, el extracto NF presentó valores significativamente mayores para estos mismos parámetros (13,6 °Brix y 17,5%) con respecto a UF y P. Estos resultados muestran el efecto de la utilización de membranas en la obtención de UF y NF. Los valores obtenidos de sólidos solubles en UF fueron menores a los obtenidos por Cassano *et al.* (2010), para el extracto ultrafiltrado de *Opuntia ficus-indica* (10 °Brix).

En UF el contenido de betacianinas (247,9 mg EB/L) no presentó diferencias significativas con respecto a la P, sin embargo, en el caso de las betaxantinas estos fueron significativamente mayores (88,6 mg EI²/L), por otro lado, en NF los valores de betacianinas (216,3 mg EB/L) y betaxantinas (79,1 mg EI²/L) fueron significativamente menores a los obtenidos en P y UF. Los valores de betalaínas

para el UF fueron mayores a los obtenidos por Cassano *et al.* (2010) tanto para betacianinas (32,8 mg EB/L) como para betaxantinas (61,6 mg EI/L).

En el caso del contenido de polifenoles totales no existió una diferencia estadísticamente significativa entre UF (659,7 EAG/L) y NF (673,5 EAG/L), pero si para P. Los resultados de polifenoles totales obtenidos para UF fueron mayores a los reportados por Cassano *et al.* (2010) (552,17 mg EAG/L).

Los resultados obtenidos para los diferentes extractos (P, UF y NF), pueden ser explicados tanto por el tamaño de poro de las membranas utilizadas como por la afinidad química existente entre la membrana y los compuestos que entran en contacto con ella. Así mismo, las diferencias entre el extracto UF de este estudio y el de Cassano *et al.* (2010), pueden ser explicadas tanto por las características de las materias primas utilizadas (ecotipo anaranjado en caso de Cassano *et al.*, (2010)) como por el tipo de membrana y las condiciones de proceso para la obtención de cada extracto ultrafiltrado.

El cambio de color total (ΔE) en los extractos UF (13,08) y NF (16,67) con respecto a P, se debe principalmente al aumento de la luminosidad (L) que se explicaría por la ausencia de los mucilagos en los extractos, los cuales sí están presentes en la pulpa.

Etapas 2. Elaboración y caracterización de micropartículas.

En el Cuadro 3, se presenta la caracterización de algunos parámetros físicos y químicos de los sistemas de micropartículas correspondientes a P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C, NF-K, elaboradas bajo condiciones óptimas.

Cuadro 3. Caracterización de las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K elaboradas bajo condiciones óptimas.

Parámetros	P-C	P-K	UF-C	UF-K	NF-C	NF-K
Betacianinas (mg EB ¹ /g)	0,36±0,03 a	0,34±0,01 a	0,36±0,02 a	0,34 ± 0,01 a	0,35±0,01 a	0,31±0,03 a
Betaxantinas (mg EI ² /g)	0,16±0,04 a	0,15±0,06 a	0,16±0,001 a	0,15 ± 0,05 a	0,16±0,00 a	0,14±0,00 a
EE ³ betacianinas (%)	99,3±0,6 a	96,6±0,4 a	99,1±0,4 a	99,6 ± 0,4 a	99,3±0,28 a	99,5±0,41 a
EE ³ betaxantinas (%)	98,6±0,6 a	98,5±1,3 a	98,7±0,6 a	99,3 ± 0,6 a	99,1±0,40 a	99,7±0,55 a
Recuperación betacianina (%)	70,9±1,9 b	68,5±1,0 b	72,4±2,43 b	77,8 ± 2,4 a	55,1±1,65 c	70,8±2,01 b
Recuperación betaxantina (%)	88,5±2,0 bc	79,2±1,2 c	96,8±2,9 a	100 ± 0,0 a	74,7±2,40 b	71,5±5,02 bc
Polifenoles (mg EAG ⁴ /g)	1,0±0,04 a	0,9±0,09 a	0,9 ± 0,02 a	0,9 ± 0,06 a	0,88 ± 0,04 a	1,47 ± 0,01 a
Solubilidad (%)	99,4±0,07 a	99,4±0,11 a	99,6±0,06 a	99,5±0,23 a	99,2±0,1 a	99,0±0,10 a
a _w	0,33±0,00b	0,36±0,00a	0,30±0,01c	0,30±0,00c	0,28±0,00d	0,26±0,01e

¹ EB: expresado como betanina; ² EI: expresado como indicaxantina. ³ EE: Eficiencia de encapsulación. ⁴ EAG: Equivalente de ácido gálico. Letras diferentes entre columnas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey (p<0,05).

Se obtuvieron altos valores de eficiencia de encapsulación (EE) de betacianinas (sobre 96%) y de betaxantinas (sobre 98%) para todos los sistemas de micropartículas estudiados. Estos resultados pueden ser atribuidos a la interacción que ocurre entre las betalaínas y los agentes encapsulantes (formación de puentes de hidrógeno y/o interacciones electrostáticas). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las eficiencias de encapsulación para los sistemas estudiados, mostrando que el tipo de extracto utilizado o el agente encapsulante no afectan de manera significativa la EE. Así mismo, Torres (2008) y Sáenz *et al.* (2009) obtuvieron altas EE para betacianinas (99,7-99,9%) y betaxantinas (97,9-99,6%), utilizando agentes encapsulantes como inulina, maltodextrina y aislado proteico de soya.

La recuperación de betacianinas y betaxantinas después del secado por atomización alcanzó valores entre 55,1-77,8% y 71,5-100%, respectivamente. Estos son similares a los obtenidos por Sáenz *et al.* (2009), 62-100% para betacianinas y 67-100% para betaxantinas, utilizando inulina y maltodextrina como agente encapsulante. El porcentaje de recuperación de betacianinas y de betaxantinas fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para las micropartículas UF-K respecto a los otros 5 sistemas de micropartículas (P-C, P-K, UF-C, NF-C y NF-K). Estos resultados se atribuyen a que el sistema UF-K tiene una mayor cantidad de agente encapsulante (30% para UF-K vs 6-12% en los otros sistemas de micropartículas estudiados, como se observa en el Cuadro 1). Un mayor contenido de sólidos permite una rápida formación de la costra sobre la superficie de la gota durante el proceso de secado, permitiendo así la difusión del agua, pero reteniendo el agente activo (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

El contenido de betacianinas, betaxantinas y polifenoles, no mostró diferencias significativas entre los sistemas en estudio.

Se alcanzaron valores de solubilidad superiores al 99% en todos los sistemas de micropartículas sin diferencias significativas entre ellos. Estos valores son

mayores a los encontrados por Cano-Chauca *et al.* (2005) (92-72%) para jugo de mango encapsulado con maltodextrinas y goma arábica, sugiriendo que el tipo de agente encapsulante afectaría la solubilidad de las micropartículas.

En el Cuadro 4, se detallan los parámetros de color (L, a*, b*, C* y Hab) de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los seis sistemas estudiados.

Los parámetros de color obtenidos en la caracterización de los sistemas de micropartículas presentaron diferencias estadísticamente significativas para todos los valores obtenidos, sin embargo, todos se presentaron como polvos rojo-púrpura con características visuales muy similares. Estos resultados muestran que el tipo de extracto utilizado o el agente encapsulante no afectan de manera importante los parámetros de color.

Cuadro 4. Parámetros de color de las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K elaboradas bajo condiciones óptimas establecidas previamente.

Parámetros de Color	P-C	P-K	UF-C	UF-K	NF-C	NF-K
L	69,3±0,15 f	67,85±0,21 a	69,51±0,06 d	69,66 ± 0,12 e	67,64 ± 0,31 b	68,02 ± 0,18 c
a*	17,61±0,15 b	19,51±0,15 f	17,93±0,20 c	17,43± 0,10 a	18,21 ± 0,16 d	18,51 ± 0,19 e
b*	-7,28±0,00 b	-7,48±0,00 a	-7,01±0,00 e	-7,17± 0,06 c	-7,18 ± 0,07 d	-6,76 ± 0,04 f
C*	19,05±0,15 b	20,9±0,15 f	19,25±0,19 c	18,88 ± 0,11 a	67,64 ± 0,31 d	68,02 ± 0,18 e
Hab	337,53±0,1 a	337,3±0,08 e	338,63±0,12 c	337,72± 0,11 b	19,58 ± 0,12 d	19,71 ± 0,18 f

Letras diferentes entre columnas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Morfología de las micropartículas

En la Figura 4 (A, B, C, D, E y F) se muestran las microfotografías de los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K. Se puede observar que las diferencias morfológicas se relacionarían con el material encapsulante (Capsul ó K-4484) utilizado durante la elaboración de las micropartículas.

Las micropartículas de los sistemas encapsulados con K-4484 (P-K, UF-K y NF, Fig. 4: B, D y F, respectivamente) presentan una morfología esférica, de superficie lisa, con algunas indentaciones y aglomeración. Las micropartículas obtenidas utilizando Capsul como agente encapsulante (P-C, UF-C y NF-C, Fig. 4: A, C y E respectivamente), también se observan semi-esféricas, de superficie rugosa con notables indentaciones y más aglomeradas, lo que estaría relacionado con la alta higroscopicidad del Capsul.

Las indentaciones en las micropartículas elaboradas con Capsul o K-4484, pueden atribuirse a altas o bajas temperaturas de secado. A menores temperaturas de secado la evaporación del agua es más lenta, por lo tanto, las partículas tienen más tiempo para encogerse, mientras que a mayores temperaturas de secado, la rápida evaporación del agua y la alta presión en el interior de las partículas, hace que esta escape rápidamente hacia el exterior generando un encogimiento más rápido (Alamilla *et al.*, 2005).

Las indentaciones formadas durante el secado, se atribuyen a la falta de plasticidad del material encapsulante. Los azúcares de cadena corta mejoran la plasticidad de las micropartículas, lo que explicaría el comportamiento en los sistemas elaborados con K-4484 como encapsulante, debido a que son dextrinas (carbohidratos de cadena corta) a diferencia de los elaborados con Capsul, que corresponden a cadenas largas de almidón.

Por lo tanto, la morfología de las micropartículas se puede ver influenciada por el tipo de agente encapsulante a utilizar, el tipo de extracto y los parámetros inherentes al proceso de secado como la temperatura de alimentación al secador, temperatura del aire de entrada al secador y temperatura de salida del secador (Kosaraju *et al.*, 2006).

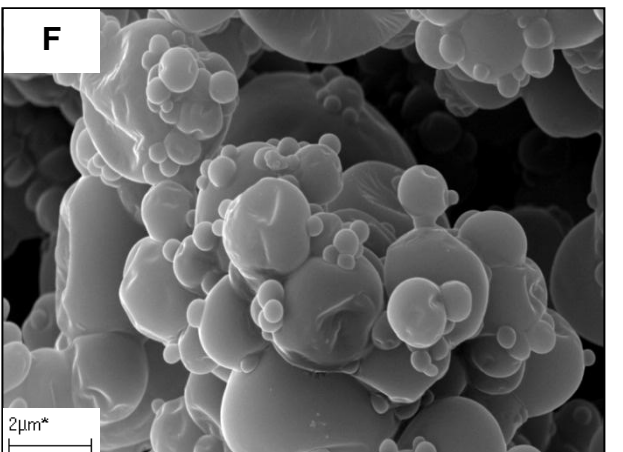
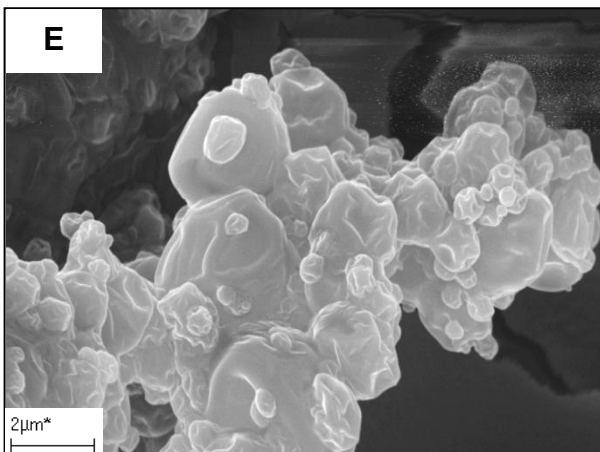
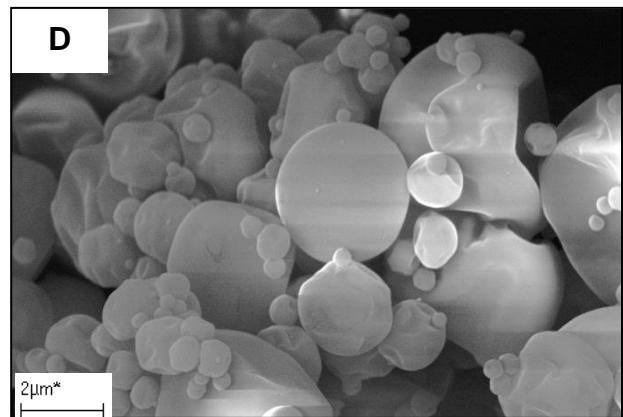
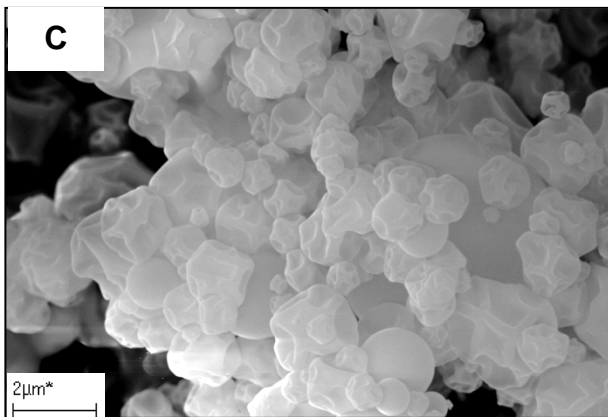
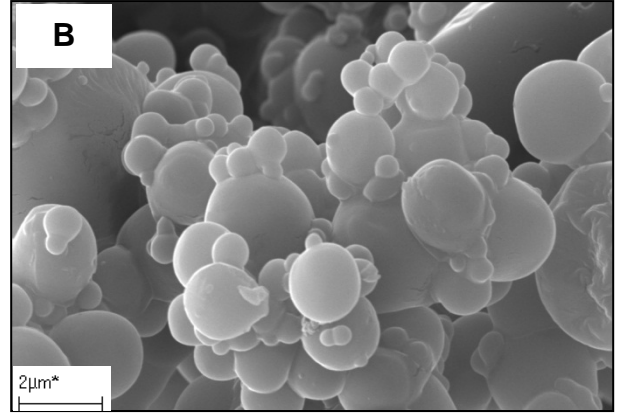
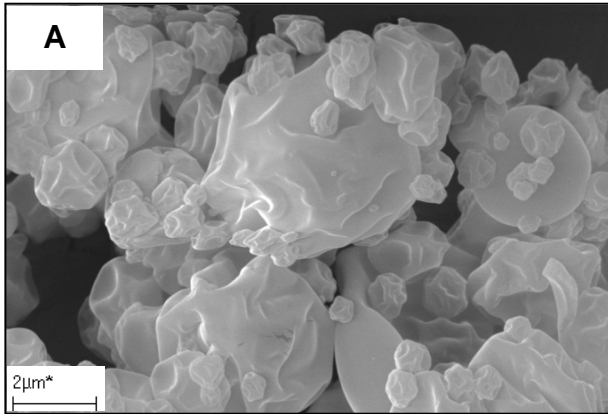


Figura 4. Microfotografías de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas: P-C (A), P-K (B), UF-C (C), UF-K (D), NF-C (E) y NF-K (F)

Etapas 3. Estudio de estabilidad de las micropartículas de pulpa de tuna, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado con Capsul y K4484, obtenidas bajo condiciones óptimas.

La cinética de degradación de betacianinas se estudió para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K y de betaxantinas para los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K; almacenados a 30, 45 y 60°C. Se determinaron los parámetros cinéticos: orden de la reacción, constantes de degradación (k_{obs}), energía de activación (E_a), factor de frecuencia (A) y parámetros termodinámicos: entalpía de activación (ΔH) y entropía de activación (ΔS).

La Figura 5 (A, B, C, D, E y F) muestra el porcentaje de retención de betacianinas versus tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K respectivamente a 30, 45 y 60°C.

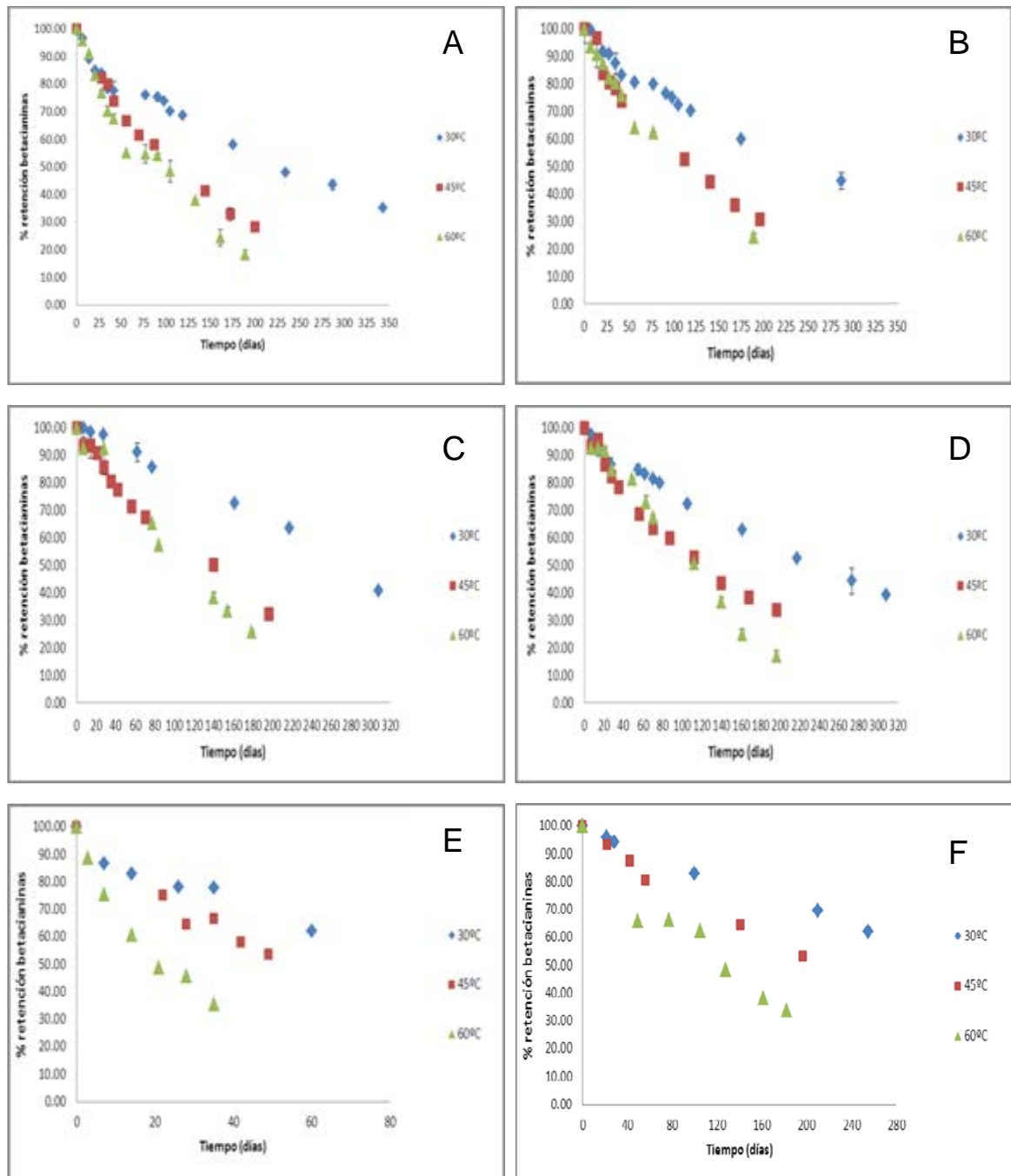


Figura 5. Porcentaje de retención de betacianinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C), UF-K (D), NF-C (E) y NF-K (F) a \blacklozenge (30°C), \blacksquare (45°C) y \blacktriangle (60°C).

La Figura 6 (A, B, C y D) muestra el porcentaje de retención de betaxantinas versus tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K, respectivamente a 30, 45 y 60°C.

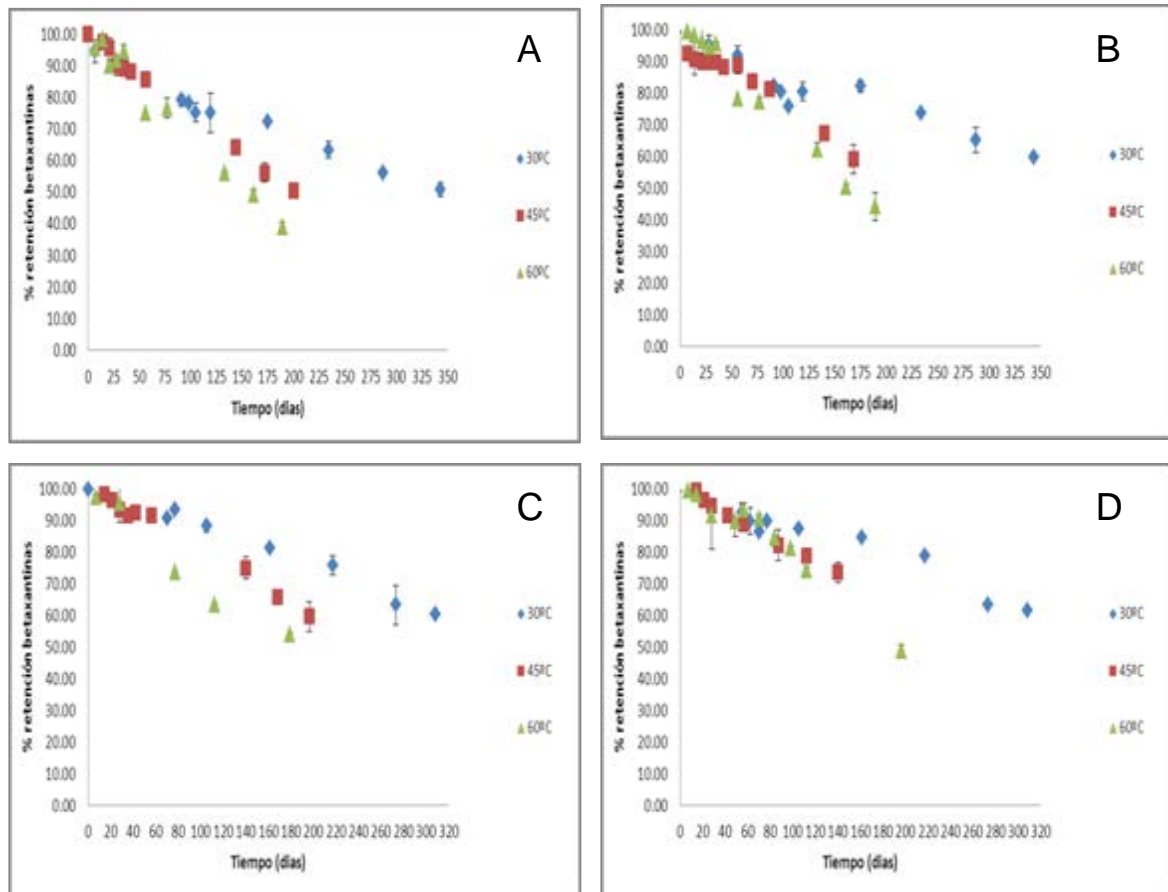


Figura 6. Porcentaje de retención de betaxantinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C) y UF-K (D) ♦ (30°C), ■ (45°C) y ▲ (60°C).

En una cinética de pseudo primer-orden, las constantes de velocidad de degradación se obtuvieron de la pendiente de un gráfico de logaritmo natural del porcentaje de retención de betalaínas vs tiempo para cada temperatura y sistema estudiado.

La Figura 7 (A, B, C, D, E y F) muestra el logaritmo natural del porcentaje de retención de betacianinas versus tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K respectivamente a 30, 45 y 60°C.

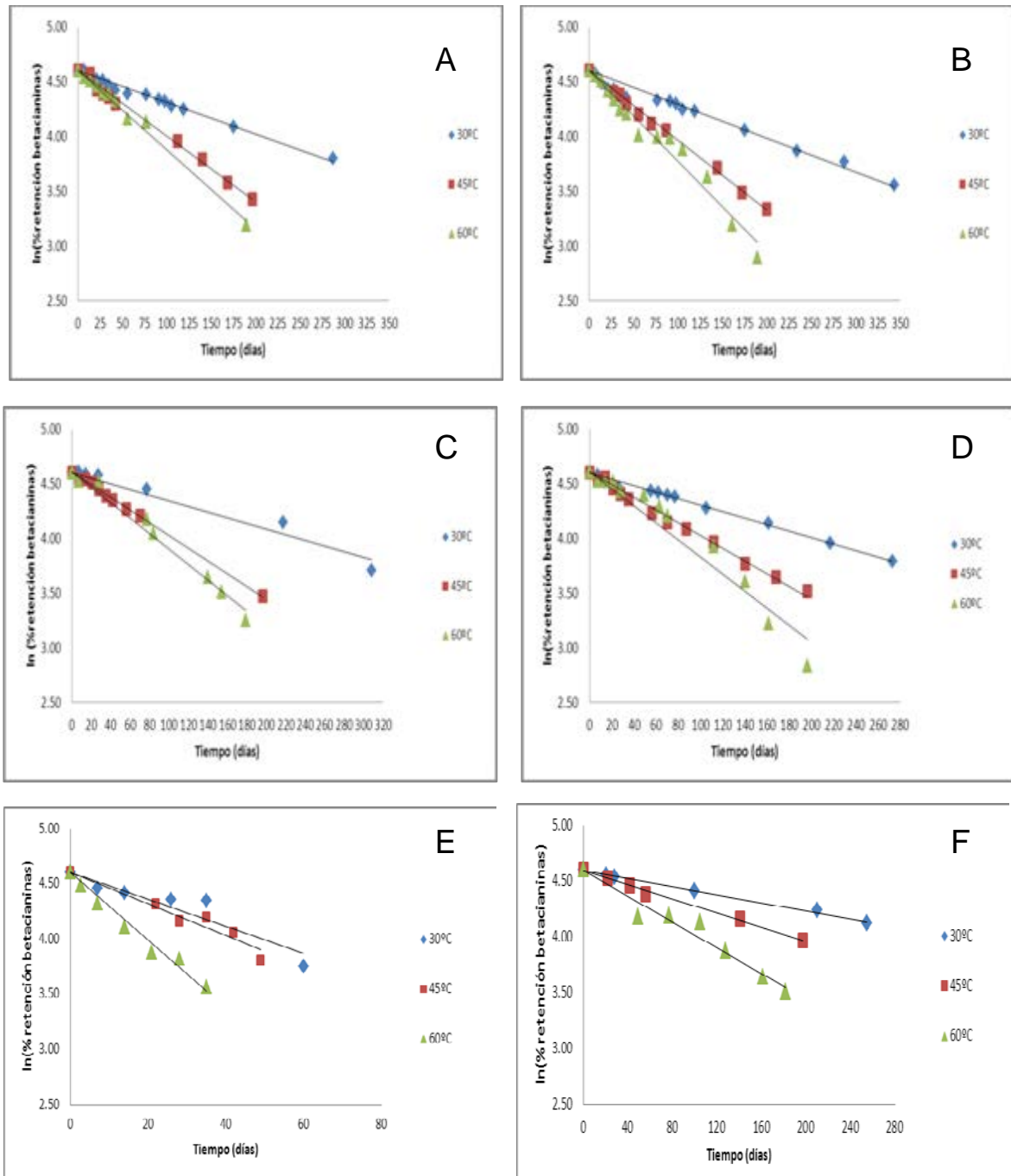


Figura 7. Logaritmo natural del porcentaje de retención de betacianinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C), UF-K (D), NF-C (E) y NF-K (F) a \blacklozenge (30°C), \blacksquare (45°C) y \blacktriangle (60°C).

En la Figura 8 (A, B, C y D) se muestra el logaritmo natural del porcentaje de retención de betaxantinas versus tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C, P-K, UF-C y UF-K a 30, 45 y 60°C.

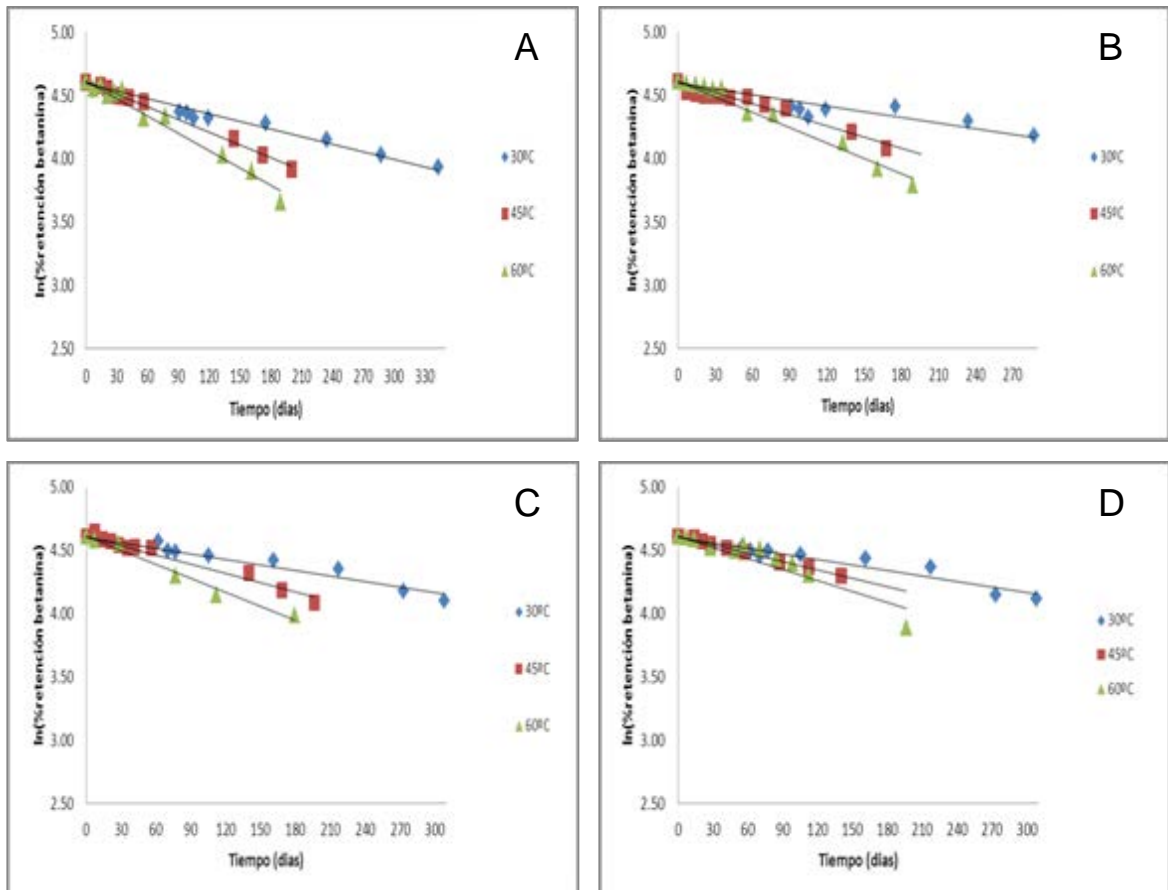


Figura 8. Logaritmo natural del porcentaje de retención, de betaxantinas versus el tiempo (días) para las micropartículas de los sistemas P-C (A), UF-C (B), P-K (C) y UF-K (D), \blacklozenge (30°C), \blacksquare (45°C) y \blacktriangle (60°C).

En el Cuadro 5, se pueden observar las constantes de velocidad de degradación (k_{obs}) de betacianinas para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K almacenados a 30, 45 y 60°C con sus respectivos coeficientes de correlación.

Cuadro 5. Constantes de velocidad de degradación (k_{obs}) de betacianinas para los sistemas de micropartículas a diferentes temperaturas.

SISTEMAS	Temperatura (°C)					
	30°C		45°C		60°C	
	$10^{-3}k_{obs}$ (días ⁻¹) ± 10 ⁻³ DS	R ²	$10^{-3}k_{obs}$ (días ⁻¹) ± 10 ⁻³ DS	R ²	$10^{-3}k_{obs}$ (días ⁻¹) ± 10 ⁻³ DS	R ²
P-C	3,1 ± 0,1 b	0,98	6,5 ± 0,1 b	0,99	8,2 ± 0,3 b	0,98
P-K	2,8 ± 0,1 b	0,98	5,7 ± 0,1 c	0,99	7,1 ± 0,1 c	0,95
UF-C	3,0 ± 0,1 b	0,99	5,8 ± 0,1 c	0,99	7,2 ± 0,2 c	0,99
UF-K	3,0 ± 0,1 b	0,99	5,7 ± 0,1 c	0,99	7,4 ± 0,7 c	0,93
NF-C	12,1 ± 0,6 a	0,88	14,2 ± 0,4 a	0,90	30,4 ± 0,6 a	0,97
NF-K	1,8 ± 0,5 c	0,99	3,2 ± 0,5 d	0,98	5,8 ± 0,2 d	0,95

Letras distintas entre sistemas indican diferencias significativas entre las constantes de degradación de betacianinas para cada uno de los sistemas estudiados a cada temperatura, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

En el Cuadro 6, se pueden observar las constantes de velocidad de degradación (k_{obs}) de betaxantinas para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K almacenados a 30, 45 y 60°C, con sus respectivos coeficientes de correlación.

Cuadro 6. Constantes de velocidad de degradación (k_{obs}) de betaxantinas para los sistemas de micropartículas a diferentes temperaturas.

SISTEMAS	Temperatura (°C)					
	30°C		45°C		60°C	
	$10^{-3}k_{obs}$ (días ⁻¹) ± 10 ⁻⁴ DS	R ²	$10^{-3}k_{obs}$ (días ⁻¹) ± 10 ⁻⁴ DS	R ²	$10^{-3}k_{obs}$ (días ⁻¹) ± 10 ⁻⁴ DS	R ²
P-C	2,1 ± 0,0a	0,87	3,1 ± 1,0a	0,99	4,3 ± 1,0a	0,96
P-K	1,3 ± 1,0b	0,93	1,8 ± 1,0c	0,96	2,5 ± 1,0b	0,97
UF-C	1,5 ± 1,0b	0,84	2,3 ± 1,0b	0,93	2,9 ± 1,0b	0,96
UF-K	1,4 ± 0,0b	0,88	1,9 ± 1,0c	0,99	2,6 ± 1,0b	0,92

Letras distintas entre sistemas indican diferencias significativas entre las constantes de degradación de betaxantinas para cada uno de los sistemas estudiados a cada temperatura, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

El coeficiente de determinación (R^2) se utilizó como criterio para determinar el orden de reacción. La degradación de las betacianinas y betaxantinas en los seis sistemas siguió una cinética de primer orden para las tres temperaturas estudiadas. El mismo orden fue reportado 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 (Serries y Biliaderis, 2001), micropartículas de pulpa y extracto etanólico de tuna púrpura con maltodextrina e inulina, almacenadas a 60°C (Saenz *et al.*, 2009) y para micropartículas de extracto de amaranto con maltodextrinas de diferente ED almacenadas a 25°C (Cai y Corke, 2000).

En soluciones elaboradas con extractos de betalainas también se han reportado cinéticas de degradación de primer orden; como por ejemplo en: pulpa de garambullo a pH 5,5 almacenadas entre 0 y 100°C (Reynoso *et al.*, 1997) y 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 indican que tanto las soluciones como las micropartículas que contienen betacianinas y betaxantinas siguen el mismo orden de degradación.

Como se puede observar en el Cuadro 5 y el Cuadro 6 un incremento en la temperatura de almacenamiento llevó a un aumento en la constante de velocidad de degradación de las betacianinas y betaxantinas. Las constantes de degradación de betacianinas de los sistemas P-C, P-K, UF-C, UF-K y NF-K ($5,8 \times 10^{-3}$ a $8,2 \times 10^{-3}$ días⁻¹) fueron menores a las indicadas por Sáenz *et al.* (2009) en micropartículas de extracto de betacianinas acuoso y etanólico con maltodextrina ($1,07 \times 10^{-2}$ días⁻¹) e inulina ($1,06 \times 10^{-2}$ días⁻¹), almacenadas a 60°C. Sin embargo, las constantes de degradación de betacianinas de todos los sistemas ($1,8 \times 10^{-3}$ a $12,1 \times 10^{-3}$ días⁻¹) fueron mayores a las informadas por Serries y Biliaderis (2001) para 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.

En soluciones de extractos de betalaínas, se han observado constantes de velocidad de degradación de betacianinas mayores a las encontradas en este estudio. En jugo de betarraga a pH 7 a 25°C ($0,61 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) (Von Elbe *et al.*, 1974), a 61,5°C ($4,5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) (Saguy *et al.*, 1978) y en pulpa de tuna a 50°C ($3,8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) (Merin *et al.*, 1987). Por lo tanto, se puede observar que las constantes de degradación son significativamente mayores en solución que las obtenidas en micropartículas, sugiriendo que la encapsulación protege a los pigmentos de las condiciones del medio que puedan inducir su degradación.

La estabilidad de las betacianinas y betaxantinas en las micropartículas puede ser explicada por los bajos valores de a_w presentes en ellas, estos limitan de manera importante las reacciones químicas que pudiesen ocurrir. Sin embargo, una mayor higroscopicidad de las partículas favorecería reacciones de hidrólisis (principal vía de degradación de la betanina) que dan como resultado ácido betalámico (amarillo brillante) y ciclo-Dopa 5-O- β -glucósido (incoloro), lo que explicaría la pérdida gradual de la coloración rojo-púrpura durante el almacenamiento (Herbach *et al.*, 2006).

Se pudo observar que cuando se compara el efecto del tipo de extracto con un mismo agente encapsulante, se observan dos comportamientos diferentes. Así el sistema NF-C presentó una constante de velocidad de degradación significativamente mayor a los elaborados con UF y P, sugiriendo que el mayor contenido de azúcares de NF disminuyó la estabilidad de las betacianinas en las micropartículas. Contrariamente, NF-K presentó una constante de velocidad de degradación significativamente menor a los elaborados con UF y P sugiriendo, que K tiene una mayor capacidad de formación de film para inhibir la higroscopicidad, con respecto a C.

Los resultados sugieren, que la velocidad de degradación de las betacianinas y betaxantinas dependen tanto del tipo de extracto utilizado en el proceso de

encapsulación como de la naturaleza del polímero utilizado como agente encapsulante (Serris y Biliaderis, 2001).

En el Cuadro 7 se pueden observar los parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betacianinas para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C, UF-K, NF-C y NF-K almacenados a 30, 45 y 60°C.

Cuadro 7. Parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betacianinas para los sistemas de micropartículas estudiados

SISTEMAS	Ea (KJ/mol)	R ²	ΔH [‡] (KJ/mol K)	ΔS [‡] (J/mol K)	R ²
P-C	27,3 ± 1,2 b	0,93	24,7 ± 1,2 b	-184,1 ± 3,9 b	0,95
P-K	26,1 ± 0,2 b	0,93	23,7 ± 0,6 b	-179,3 ± 2,5 b	0,92
UF-C	24,9 ± 1,0 b	0,93	22,3 ± 1,0 b	-175,9 ± 3,2 b	0,90
UF-K	25,0 ± 2,4 b	0,95	22,4 ± 2,4 b	-176,1 ± 7,8 b	0,92
NF-C	24,9 ± 0,2 b	0,99	22,7 ± 1,0 b	-187,3 ± 8,5 a	0,99
NF-K	32,2 ± 0,3 a	0,95	34,1 ± 2,1 a	-195,2 ± 9,0 a	0,94

Letras distintas entre filas indican diferencias significativas entre los parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betacianinas para cada uno de los sistemas estudiados, según la prueba de Tukey (p<0,05).

En el Cuadro 8 se pueden observar los parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betaxantinas para los sistemas de micropartículas P-C, P-K, UF-C y UF-K, almacenados a 30, 45 y 60°C.

Cuadro 8. Parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betaxantinas para los sistemas de micropartículas estudiados

SISTEMAS	Ea (KJ/mol)	R ²	ΔH [‡] (KJ/mol K)	ΔS [‡] (J/mol K)	R ²
P-C	21,2 ± 1,3 a	0,99	18,6 ± 1,3 a	-160,1 ± 4,3 a	0,99
P-K	20,1 ± 1,1 a	0,96	17,5 ± 1,1 a	-153,8 ± 0,7 a	0,92
UF-C	20,5 ± 3,2 a	0,99	17,9 ± 3,3 a	-155,7 ± 10,0 a	0,98
UF-K	20,6 ± 2,1 a	0,99	18,0 ± 2,4 a	-155,9 ± 6,6 a	0,99

Letras distintas entre filas indican diferencias significativas entre los parámetros de Arrhenius y termodinámicos de las betaxantinas para cada uno de los sistemas estudiados, según la prueba de Tukey (p<0,05).

Las entalpías de activación (ΔH[‡]) y entropías de activación (ΔS[‡]) se obtuvieron de la pendiente e intercepto, respectivamente del gráfico de ln (k/T) vs 1/T. La

energía de activación es la energía mínima necesaria para una reacción y es el factor de más importancia para determinar la magnitud de la velocidad de reacción. En este estudio, el cambio de energía de activación de betacianina para el sistema NF-K fue significativamente mayor con respecto a los otros sistemas estudiados, lo cual fue concordante con la menor constante de velocidad de degradación de betalaínas. Serris y Biliaris (2001) reportaron valores mayores en la energía de activación para sistemas de micropartículas de extracto de betarraga con pululano (83,65 KJ/mol), maltodextrina (ED 5) (66,8 KJ/mol) y maltodextrina (20 ED) (41,8 KJ/mol).

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 9 y 10 se muestra la línea isocinética de degradación de betacianinas y betaxantinas, respectivamente.

Los coeficientes de correlación de las betacianinas ($r^2 = 0,9616$) y betaxantinas ($r^2 = 0,9811$), sugieren que la degradación de estos pigmentos en las micropartículas, ocurren por un mismo mecanismo, independiente del tipo de agente encapsulante y extracto utilizado.

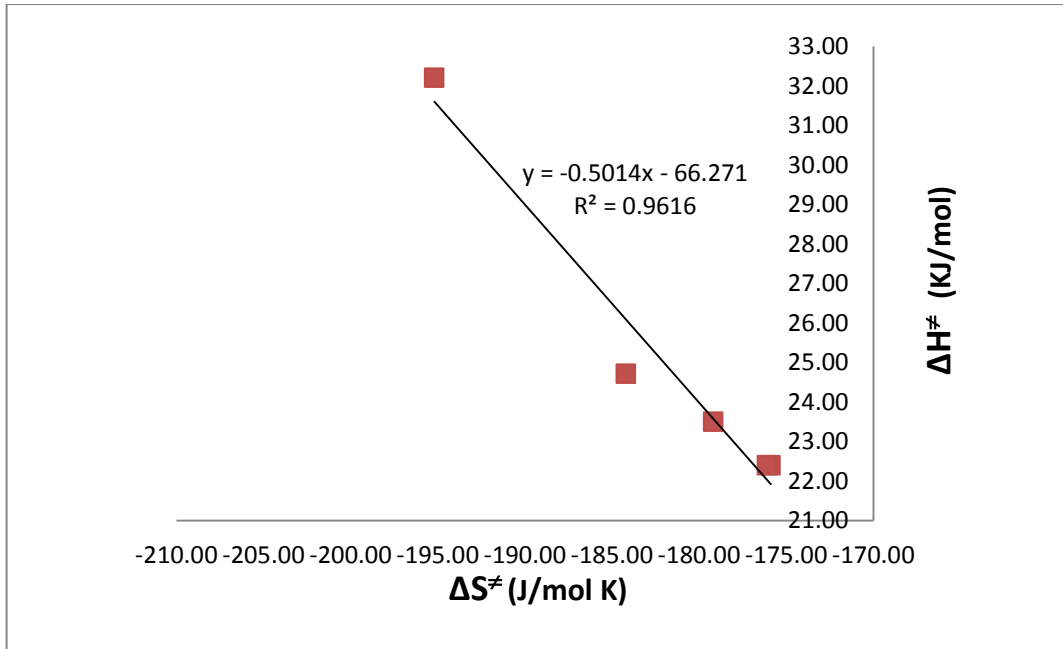


Figura 9. Línea isocinética para degradación de las betacianinas de los sistemas de micropartículas P-C, UF-C, P-K, UF-K, NF-K y NF-C.

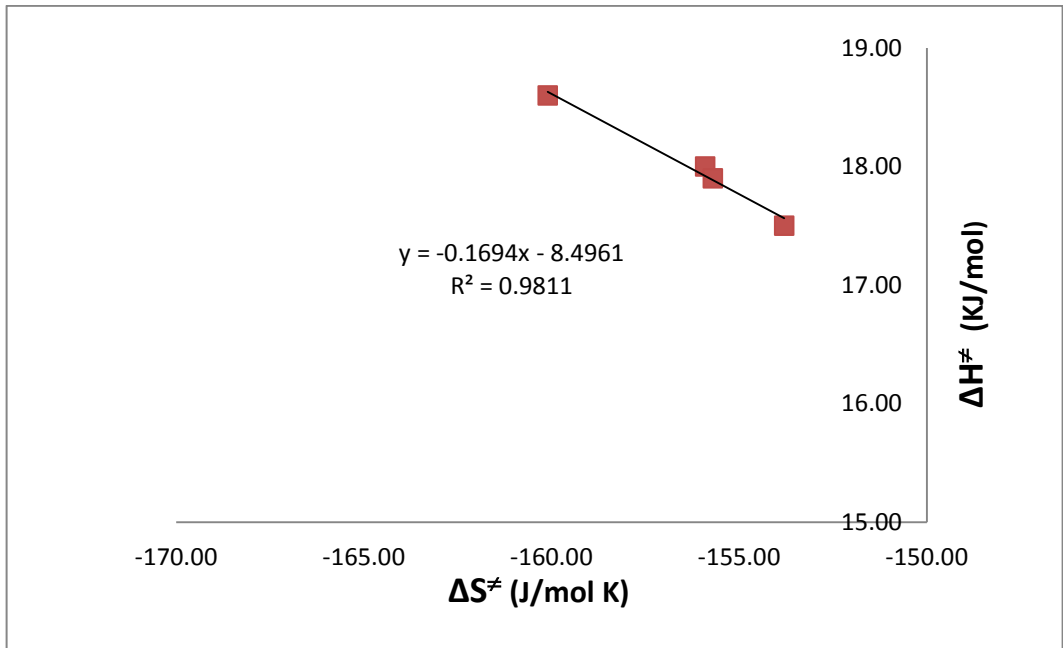


Figura 10. Línea isocinética para degradación de las betaxantinas de los sistemas de micropartículas P-C, UF-C, P-K, UF-K, NF-K y NF-C.

CONCLUSIONES

- Mediante el secado por atomización de la pulpa, extracto nanofiltrado y extracto ultrafiltrado de tuna púrpura, se logró un alto porcentaje de eficiencia de encapsulación y retención de betacianinas y betaxantinas, para los dos agentes encapsulantes utilizados, Capsul y K-4484.
- El estudio de estabilidad mostró que las micropartículas del sistema NF-K presentaron una constante de velocidad de degradación de betacianinas significativamente menor, respecto a los otros sistemas estudiados, lo que fue concordante con la mayor energía de activación.
- El cálculo de los parámetros termodinámicos permitió determinar que la relación lineal entre la entalpía de activación y la entropía de activación mostró un mecanismo de degradación similar para betacianina e indicaxantina.
- La hipótesis planteada no se cumplió, ya que la estabilidad de betalaínas en las micropartícula no solo dependió del extracto (otros componentes presentes como azúcares) sino que también de las propiedades del agente encapsulante (higroscopicidad). Las mayores constantes de velocidad de degradación de betacianinas fueron para NF-C y las menores para NF-K, quedando los sistemas con P y UF en lugares intermedios.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J., Jiménez-Aparicio, A. y Gutiérrez-López, G. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67: 179-184.

AOAC. 1996. Official Methods of Analysis of the association Official Analytic Chemists. 14^o Edition. Washington D.C. U.S.A. 1141p.

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

Cai, Y. y Corke, H. 2000. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science* 65: 1248-1252.

Cano-Chauca, M., Stringheta, P., Ramos, A. 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.

Cassano, A., Conidi, C., Timpone, R., D'aveella, M. y Drioli, E. 2010. Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination* 250: 1101-1104.

Castellar, R., Obón, J., Alacid, M. y Fernandez-Lopez, J. 2003. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2772-2776.

Cissé, M., Vaillant, F., Pallet, D. y Dornier, M. 2011. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Food Research International* 44: 2607-2614.

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., Jiménez, A. and Paredes-López, O. 2000. Natural Pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 173-289.

Desai, K. y Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology* 23: 1361-1394.

García, V. 2008. Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia stricta*. Proyecto Final de Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Cartagena, España. 92p.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, 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. and Mulligan, C. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition* 50:213-224

Goud, K., Desai, K. y Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology: An International Journal* 23: 1361-1394.

Gouin, S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* 15: 330-347.

Guizard, C. 1999. Técnicas membranarias de filtración de líquidos: micro, ultra, nanofiltración y osmosis inversa. Versión # 2. Escuela Ingeniería Química, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. Cuaderno FIRP S451B. Merida, Venezuela. 56p.

Herbach, K., Stintzing, F. y Carle, R. 2006. Betalain stability and degradation-structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science* 71: 41-50.

Kosaraju, S., D'ath, L. y Lawrence, A. 2006. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers* 64: 163-167.

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.

Morales, M., Sáenz, C. and Robert, P. 2008. Bioactive compounds in toppings from colored cactus pear cultivated in Chile. p 127-130. In: Proceedings of the VIth International Congress on Cactus Pear and Cochineal. Paraiba, Brasil, October 22-26, 2007. Paraiba, Brasil.

National Starch and Chemical. 2001^A. Ficha técnica del producto: Capsul. [Disponible en <http://www.foodinnovation.com/foodinnovation/en-us/Pages/Home.aspx>]

National Starch and Chemical ^B. Ficha técnica del producto: K-4484. [Disponible en <http://www.foodinnovation.com/foodinnovation/en-us/Pages/Home.aspx>]

Nedovic, V., Kasulevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. 2011. An Overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1:1806-1815.

Obón, J., Castellar, M., Alacid, M. y Fernández-López, J. 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.

Osborne, D. y Voogt, P. 1986. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 258p.

Raventós, M. 2005. Tecnología de membranas. En: Industria alimentaria tecnologías emergentes. Ediciones UPC. Barcelona. Pp 173-210.

Reynoso, R., García, A., Morales, D. y Gonzales de Mejia, E. 1997. Stability of betalain pigments from a Cactaceae fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 2884-2889.

Robert, P., Carlsson, R., Romero, N. y Masson, L. 2003. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from *Rosa mosqueta* (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. *Journal American Oils Chemistry Society* 80:1115-1120.

Rudra, S., Singh, H., Basu, S. y Shivhare, U. 2008. Enthalpy entropy compensation during thermal degradation of chlorophyll in mint and coriander puree. *Journal of Food Engineering* 86: 379–387.

Saézn, C. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 165 p.

Sáenz, C. y Sepúlveda, E. 2001. Ecotipos coloreados de tuna (*Opuntia ficus-indica*). *Aconex* 72: 29-32.

Saéenz, C., Tapia, S., Chávez, 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., Kopelman, I. y Mizrahi, S. 1978. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 26: 360-362.

Sepulveda, E., Sáenz, C. y Gómez, C. 2003. Determinación de betanina en ecotipos de tuna roja colectados en Chile. p 282-285. Memoria IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Zacatecas, México.

Serries, G. y Biliaderis, G. 2001. Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. Journal of the Sciences of Food and Agricultural 81: 691-700.

Singleton, V. y Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Stintzing, F. y Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. Trends in Food Science and Technology 15: 19-38.

Stintzing, F., Herbach, K., Moßhammer, M., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C., Bunch, R. y Felkers, P. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 442-451.

Torres, V. 2008. Microencapsulación de “polifenoles y betalaínas” desde un extracto acuoso de tuna (*Opuntia ficus-indica*), mediante secado por atomización. Trabajo de titulación para optar al título de Ingeniero en Industria Alimentaria.

Universidad Tecnológica Metropolitana, Facultad de Ciencias Naturales, Matemáticas y del Medio Ambiente; y Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago, Chile. 65p.

Vergara, C. 2013. Extracción y estabilización de betalaínas de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) mediante tecnología de membranas y microencapsulación, como colorante alimentario. Tesis para optar al grado de Doctor en Nutrición y Alimentos. Universidad de Chile, pp 111.

Von Elbe, J., Maing, I. y Amundson, C. 1974. Colour stability of betanin. Journal Food Science 39: 334-7.

ANEXOS

Anexo I

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 70%, reactivo de Antrona, solución de glucosa (0,1%), agua destilada.

Procedimiento

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

Antrona (blanco) y otro con 1 mL de glucosa (0,1%) más los 5 mL de reactivo de Antrona (patrón).

Para los cálculos del contenido de azúcares totales, se realizó una curva de calibrado de glucosa, Figura 12. ($Y=4,564X + 0,046$; $R^2=0,99$, Donde: X= Concentración de glucosa y Y= Absorbancia de la muestra (U.A.)).

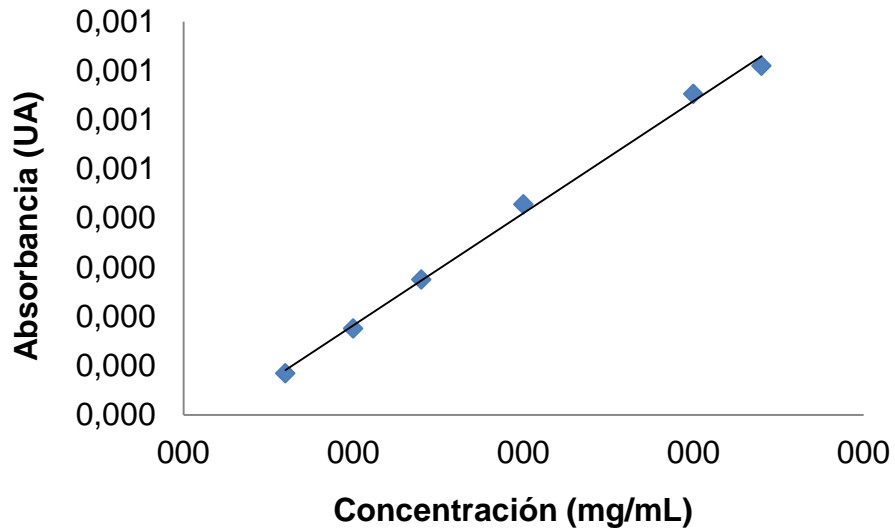


Figura 11. Curva de calibración de glucosa

Anexo II

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

Fundamento

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

Materiales

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

Preparación de la muestra de pulpa

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

Método Folin-Ciocalteu

En un matraz aforado de 10 mL se colocó 0,1 mL de 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. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm.

Se usó un blanco que estuvo compuesto por 5 mL de agua destilada, 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 1,7 mL de carbonato de sodio y se aforó a 10 mL con agua destilada. Para los cálculos del contenido de polifenoles totales, se realizó una curva de calibrado de ácido gálico, Figura 13. ($Y=0,001X + 0,065$; $R^2=0,99$, Donde: X= Concentración de polifenoles y Y= Absorbancia de la muestra (U.A.)).

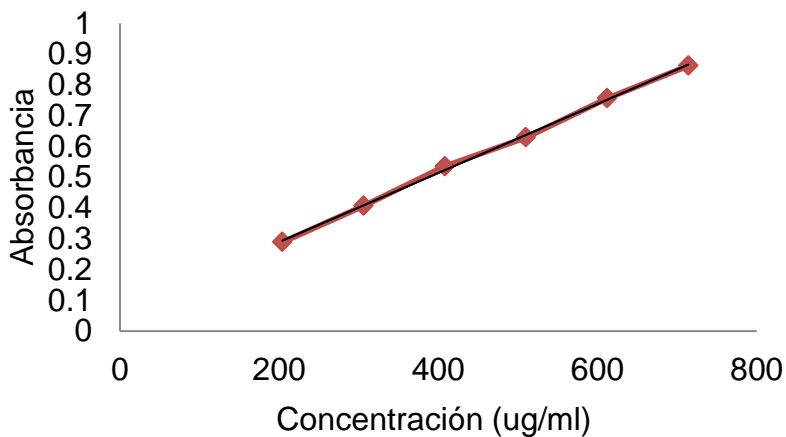


Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico

Anexo III

Determinación del contenido de betalaínas por espectrofotometría

Materiales

- Buffer McIlvaine's pH 6,5: se preparó una solución A de ácido cítrico 0,1 M y una solución B de fosfato monosódico 0,2 M. Para 100 mL de solución se mezclaron 29,65 mL de A y 70,35 mL de B.

Procedimiento

Preparación de la muestra de pulpa: Se pesó 4 g y se aforó con agua destilada en un matraz de 25 mL, posteriormente se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm en una centrifuga modelo 5804 R Eppendorf AG, el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0,45 μm , se tomó una alícuota de 1 mL que se aforó en un matraz de 10 mL con la solución buffer McIlvaine's.

Extractos Ultrafiltrado y Nanofiltrado: Se tomó una alícuota de 0,25 mL y se aforó con la solución de McIlvaine's en un matraz de 10 mL.

Betalaínas totales y superficiales de las micropartículas: se tomó 1 mL de la muestra preparada (ver Anexo IV), y se aforó con reactivo buffer McIlvaine's en un matraz de aforo de 10 mL.

Betalaínas en la bebida refrescante: Se tomó 4 mL de la bebida y se aforó con la solución McIlvaine's en un matraz de 10 mL.

Para todas estas mediciones de betacianinas y betaxantinas en el espectrofotómetro se usó una longitud de onda de 538 nm y 480 nm, respectivamente.

Para conocer el contenido de betacianina y betaxantina, expresado como betanina e indicaxantina, respectivamente, fue calculado como se describe en la siguiente ecuación:

Para muestras de pulpa y micropartículas, se calculó el contenido betaláínas con la siguiente fórmula:

Anexo IV

Método para determinar betalaínas totales y superficiales en micropartículas

Betalaínas totales

Se pesó 0,2 g de micropartículas, se disolvieron con 2 mL de una solución compuesta por etanol - ácido acético - agua destilada (50:8:42), y se homogenizaron utilizando un agitador Vortex mixer (Cenco Instrument, breda, the netherlands), durante un minuto. Para asegurar la ruptura de la micropartícula se sonicó durante 50 minutos (intervalos de 20 minutos y 10 de descanso), con un sonicador Ultrasonic FS30H. Luego se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm en una centrifuga Hettich Rotofix 32. Finalmente del sobrenadante obtenido se realizaron las mediciones para betalaínas, según la metodología expuesta en el Anexo III.

Betalaínas superficiales

Para la determinación de betalaínas superficiales, se realizó una extracción directa con 0,1 g de micropartículas en 2 mL de una mezcla etanol-metanol (1:1), en un agitador Vortex mixer (Cenco Instrument, Breda, The Netherlands), durante un minuto. Luego se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm en una centrifuga Hettich Rotofix 32. Del sobrenadante obtenido se realizaron las mediciones de betalaínas según la metodología descrita en el Anexo III.

Anexo V

Método para determinar la capacidad antioxidante radical oxígeno (ORAC)

Materiales y Reactivos:

- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Cloruro de Potasio (KCl)
- Dihidrógeno Fosfato de Sodio (NaH_2PO_4)
- Dihidrógeno Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)
- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Fluoresceína
- AAPH
- Estándar Trolox
- Espectrofluorímetro

Observación: Mantener todas las soluciones y estándares de trabajo refrigeradas y guardadas de la luz.

Solución PBS (Buffer):

Para un Litro de solución Buffer pesar las siguientes cantidades:

- 8.06 gr. de NaCl
- 0.22 gr. de KCl
- 1.15 gr. de NaH_2PO_4
- 0.20 gr. de KH_2PO_4

Disolver en 750 mL de agua Milli-Q y luego ajustar el pH a 7 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio al 10%, enraazar a un litro y luego agitar.

Preparación solución Stock Fluoresceína (duración 07 días - mantener siempre refrigerado)

Pesar exactamente 22 mg de Fluoresceína en un matraz aforado ambar de 50 mL, disolver y enrazar con solución PBS.

Solución diaria Fluoresceína (duración 1 día a temperatura ambiente)

Tomar una alícuota de 0.050 mL de solución stock en un matraz aforado ambar de 10 mL, homogenizar y realizar la segunda dilución de 2 mL en un matraz aforado de 100 mL y aforar con solución PBS pH 7.0 y homogenizar agitando.

Solución radical AAPH (duración 1 día refrigerado)

Relación peso/volumen: 46mg/mL

Preparar un volumen necesario de solución a ocupar de acuerdo a la cantidad de muestras a analizar en el día.

Pesar la cantidad de masa necesaria y trasvasijar en un matraz de volumen apropiado con tapa, disolver con solución PBS previamente mantenida a 37°C, homogenizar agitando.

Solución Stock Estándar Trolox (Duración dos días refrigerado en ausencia de luz)

Pesar exactamente 25 mg de estándar Trolox en un matraz aforado ámbar de 50 mL, disolver directamente con un volumen de buffer mantenido a 37°C, aforar luego con solución PBS.

Curva de Calibrado Estándar Trolox (Duración un día en ausencia de luz)

Punto	Alícuota	Vol. matraz	Concentración (µM)	Solución
1	0.5 ml (Sol Stock)	10 ml	100	1
2	5.0 ml (Sol. 1)	10 ml	50	2
3	5.0 ml (Sol. 2)	10 ml	25	3
4	5.0 ml (Sol. 3)	10 ml	12.5	4

Preparación muestra (Duración un día a temperatura ambiente y luz)

Previo a tratar la muestra si es necesario llevar a cabo una centrifugación por 10 min. y filtrar por una membrana Whatman 40 o similar.

Realizar una disolución de 50 µL a partir de la muestra original en un matraz aforado de 50 mL, enraizar con solución PBS. Tomar una alícuota de 50 µL y depositarla en un matraz de 20 mL y aforar con solución PBS.

Preparación pocillo para lecturas

En cada pocillo colocar 150 µL de fluoresceína y 25 µL de AAPH, agregar 25 µL de blanco muestra y estándar, agitar suavemente por algunos segundos. Volver a colocar la placa en el instrumento e iniciar el programa seleccionado.

Calculo

La fluoresceína fue medida inmediatamente después de la adición de AAPH hasta que la intensidad fue menor al 5% del valor de lectura inicial. Los valores ORAC, expresados en µmoles equivalentes de Trolox, calculando mediante la siguiente formula:

$$\text{ORAC} = (\text{AUC Muestra} - \text{AUC Blanco}) / (\text{AUC Trolox} - \text{AUC Blanco}) * \text{C Trolox} * \text{K}$$

Dónde:

AUC: Área Bajo la Curva

C: Concentración Estándar Trolox

K: Factor de dilución de las muestras (K x 0.001 x 0.025)

Anexo VI

Carta de representación del color

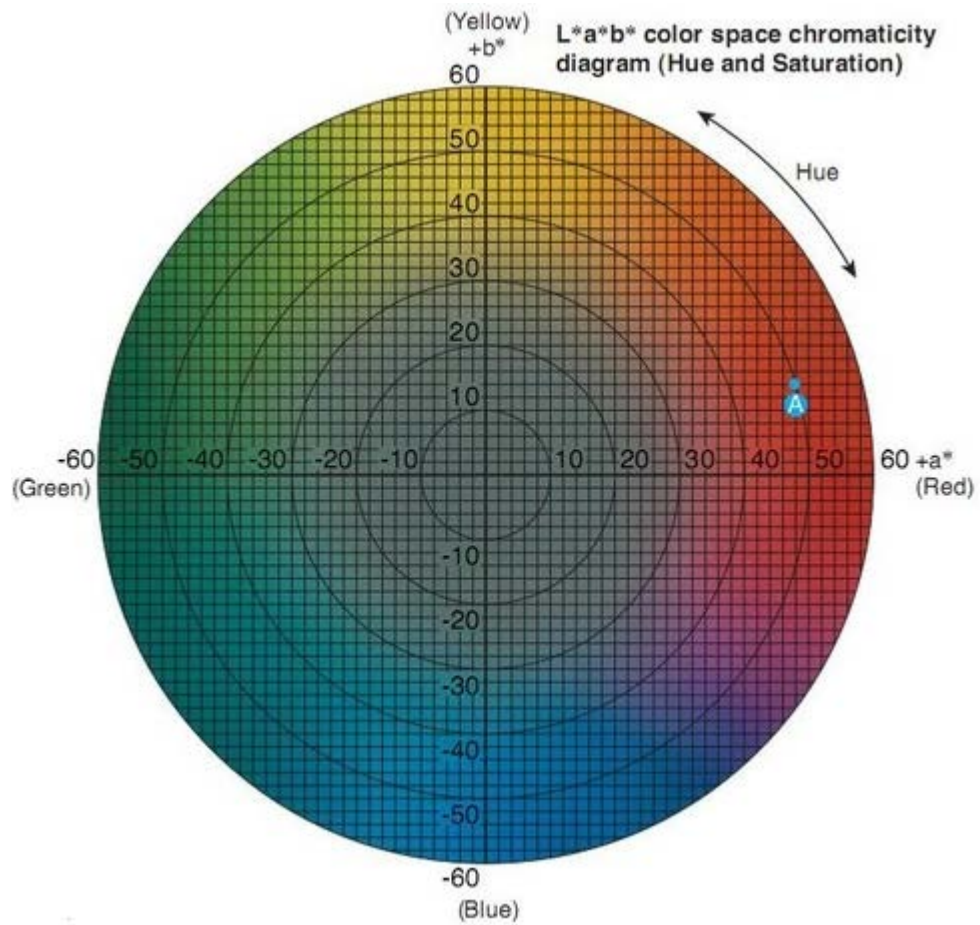


Figura 13. Carta de color (Fuente: Konica Minolta Sensing, INC. 2007)

