



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos

**“Encapsulación de jugo de maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) por secado por atomización y liofilización: estabilidad en matriz alimenticia y en modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*”**

**PATROCINANTE**

**Dra. Paz Robert Canales**

Departamento Ciencia de los  
Alimentos y Tecnología Química

Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas

Universidad de Chile

**DIRECTORES DE MEMORIA**

**Dra. Paz Robert Canales**

Departamento Ciencia de los  
Alimentos y Tecnología Química

Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas

Universidad de Chile

**Dra. Carolina Fredes González**

Departamento de Ciencia de los  
Alimentos y Tecnología Química

Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas

Universidad de Chile

**CAMILA JAVIERA BECERRA CONEJEROS**

Santiago de Chile, 2017.

## **Agradecimientos**

En primer lugar a mis padres, Lucy y Raúl por su amor infinito y apoyo incondicional durante todos los años de mi carrera y de mi vida. Por siempre creer en mí, por aconsejarme e inspirarme a ser cada día mejor.

A mi patrocinante de memoria y directora de tesis, Dra. Paz Robert, por acogerme en su equipo de trabajo, por su apoyo y sus enseñanzas.

A Carolina Fredes, por su dedicación y compromiso con este proyecto y conmigo, por guiarme y enseñarme constantemente, por su confianza y cariño. Sin duda alguna, esta tesis no habría podido salir adelante sin ti.

A Ian por su amor, compañía y apoyo, por creer en mí, escucharme en mis momentos de estrés y ayudarme ver las dificultades de una forma más simple.

A mis amigos de la U, Claudia Saavedra, Javiera Ávila, Carla Sáez, Camila Hernández, Francisco Agurto y Fabiola Mardones, por su increíble y loca amistad, su compañía, apoyo y por hacer inolvidables todos estos años de estudio.

A mis amigas Daniela Arriagada, Francisca Herrera y Daniela Seriche, por acompañarme en cada una de las etapas de mi vida, por aconsejarme y brindarme su linda e incondicional amistad.

A mis compañeros de laboratorio, María Jesús Osorio, Ana González, Guibeth Morelo y Cristian Encina, por su ayuda y compañía en esos largos días de trabajo.

A Víctor Miranda, Julián Bejarano, Juan Carlos Moreno y todas las personas que colaboraron indirectamente en este proyecto, brindando su ayuda desinteresadamente.

Al proyecto Fondecyt Postdoctoral N° 3150342 por el financiamiento otorgado para llevar a cabo este trabajo.

## Abreviaturas

**AE:** Agente encapsulante

**AT:** Antocianinas totales

**a<sub>w</sub>:** Actividad de agua

**BA:** Bioaccesibilidad

**CA:** Capacidad antioxidante

**Ci-3,5-diglu:** Cianidina-3,5-diglucósido

**Ci-3-glu:** Cianidina-3-glucósido

**Ci-3-sa:** Cianidina-3-sambubiósido

**Ci-3-sa-5-glu:** Cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido

**Del-3,5-diglu:** Delfinidina-3,5-diglucósido

**Del-3-glu:** Delfinidina-3-glucósido

**Del-3-sa:** Delfinidina-3-sambubiósido

**Del-3-sa-5-glu:** Delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidracil

**EE:** Eficiencia de encapsulación

**FRAP:** Poder antioxidante reductor del hierro (Ferric Reducing Antioxidant Power)

**HPLC-DAD:** Cromatografía líquida de alta resolución con arreglo diodo

**JM:** Jugo de maqui

**L:** Liofilización

**LA:** Liofilización con molienda con molinillo

**LB:** Liofilización con molienda con mortero

**MSR:** Metodología de superficie de respuesta

**PT:** Polifenoles totales

**SA:** Secado por atomización

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy)

**TGI:** Tracto gastrointestinal

## Compuestos químicos estudiados

**Cianidina-3,5-diglucósido:** cyanidin-3,5-diglucoside (PubChem CID: 441688).

**Cianidina-3-glucósido:** cyanidin-3-glucoside (PubChem CID: 92131208).

**Cianidina-3-sambubiósido:** cyanidin-3-sambubioside (PubChem CID: 6602304).

**Cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido:** cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside  
(PubChem CID: 44256731).

**Delfinidina-3,5-diglucósido:** delphinidin-3,5-diglucoside (PubChem CID: 10100906).

**Delfinidina-3-glucósido:** delphinidin-3-glucoside (PubChem CID: 443650).

**Delfinidina-3-sambubiósido:** delphinidin-3-sambubioside (PubChem CID: 44256884).

**Delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido:** delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside  
(PubChem CID: 44256891).

## Índice general

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Maqui. ....	5
2.2. Antocianinas. ....	6
2.3. Estabilidad de antocianinas.....	7
2.4. Microencapsulación.....	8
A. Secado por atomización.....	9
B. Liofilización.....	10
2.5. Agentes encapsulantes. ....	12
2.6. Reconstitución del jugo de maqui.....	13
2.7. Estabilidad de antocianinas en matriz alimenticia.....	14
2.8. Modelo de simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo General.....	17
4.2. Objetivos Específicos.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Materiales.....	18
5.2. Metodología.....	18
5.2.1 Estudio de la encapsulación de JM por SA, mediante un diseño estadístico que involucra condiciones de formulación y proceso aplicando la MSR.....	18
5.2.1.1 Caracterización de JM por análisis físicos y químicos.....	18

5.2.1.2. Estudio de la encapsulación de JM por SA mediante un diseño estadístico que involucra condiciones de formulación y proceso.....	20
5.2.1.3. Preparación de micropartículas de JM obtenidas por L.....	22
5.2.2. Caracterización física, química y morfológica de las micropartículas obtenidas por SA bajo condiciones óptimas y micropartículas obtenidas por L.....	23
5.2.3. Estudio de propiedades de reconstitución de micropartículas de JM.....	24
5.2.4. Análisis de la influencia de una matriz alimenticia sobre la estabilidad de las antocianinas de JM microencapsuladas por SA y L.....	25
5.2.5. Estudio de estabilidad de antocianinas en micropartículas de JM en un modelo de simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1. Estudio de la encapsulación de JM por SA, mediante un diseño estadístico que involucra condiciones de formulación y proceso aplicando la MSR.....	28
6.1.1 Caracterización del JM.....	28
6.1.2 Encapsulación de antocianinas de JM por SA.....	31
6.2. Comparación de las características física, química y morfológica de las micropartículas obtenidas por SA bajo condiciones óptimas y micropartículas obtenidas por L.....	34
6.3. Estudio de propiedades de reconstitución de micropartículas de JM.....	41
6.4. Análisis de la influencia de una matriz alimenticia sobre la estabilidad de las antocianinas de JM microencapsuladas por SA y L.....	44
6.5. Estudio de estabilidad de antocianinas en micropartículas de JM en un modelo de simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	49
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	70

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura básica de una antocianidina.....	6
<b>Figura 2.</b> Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD del perfil de antocianinas a 520 nm. A: JM; B: micropartículas de JM obtenidas por SA; C: micropartículas de JM obtenidas por L.....	29
<b>Figura 3.</b> Gráfico de Superficie de respuesta para optimización con diseño composito central en microencapsulación de JM/MD:APS.....	33
<b>Figura 4:</b> Morfología de micropartículas (SEM): Fotografías de micropartículas de A: SA, B: Liofilización Bloque, C: LA y D: LB.....	40
<b>Figura 5:</b> Contenido de antocianinas individuales en las micropartículas SA, LA y LB reconstituidas.....	43
<b>Figura 6:</b> Contenido inicial de antocianinas en yogur con micropartículas de JM.....	44
<b>Figura 7:</b> Evolución de la retención (%) de antocianinas individuales en muestras de yogur con JM y micropartículas de JM almacenadas durante 35 d a 5°C. A: del-3-sa-5-glu, B: del-3,5-diglu, C: ci-3-sa-5-glu + ci-3,5-diglu, D: del-3-sa, E: del-3-glu, F: ci-3-glu.....	45
<b>Figura 8:</b> Estructura química de antocianinas monoglicosiladas de JM. A: del-3-glu B: ci-3-glu C:del-3-sa.....	47

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Contenido de antocianinas del JM.....	30
<b>Tabla 2.</b> EE de AT e individuales en micropartículas obtenidas por SA y L.....	35
<b>Tabla 3.</b> Características físicas y químicas de micropartículas de JM/ MD:APS obtenidas por SA y L.....	36
<b>Tabla 4.</b> Reconstitución de micropartículas obtenidas por SA y L.....	41
<b>Tabla 5.</b> Valores de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las antocianinas en yogur con micropartículas de JM durante el almacenamiento a 4 °C.....	47
<b>Tabla 6.</b> BA de antocianinas de micropartículas de JM usando un modelo de digestión <i>in vitro</i> .....	50



## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Curva de calibración de glucosa para cuantificación de azúcares totales en JM.....	69
<b>Anexo 2.</b> Curva de calibración cianidina-3-glucósido para cuantificación de AT e individuales.....	60
<b>Anexo 3.</b> Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales en JM.....	70
<b>Anexo 4.</b> Curva de calibración de hierro para medir Actividad Antioxidante por FRAP.....	70
<b>Anexo 5.</b> Curva de cinética de degradación del DPPH para medir Actividad Antioxidante (EC50). (a) Muestra 1, (b) Muestra 2.....	71
<b>Anexo 6.</b> Descripción Yogur natural SOPROLE para estabilidad de micropartículas en yogur comercial.....	72
<b>Anexo 7.</b> Información de ficha técnica JM 65 °Brix.....	73
<b>Anexo 8.</b> Condiciones experimentales, rendimiento y EE de AT e individuales para el diseño experimental de JM microencapsulado con MD y APS.....	74
<b>Anexo 9.</b> Diagrama de Pareto para Rendimiento .....	74
<b>Anexo 10.</b> Diagrama de Pareto para EE de antocianinas totales.....	75
<b>Anexo 11.</b> Distribución diámetro de partículas SA .....	75
<b>Anexo 12.</b> Distribución diámetro de partículas LA.....	76
<b>Anexo 13.</b> Distribución diámetro de partículas LB.....	76

## Resumen

Se elaboraron micropartículas de jugo de maqui (JM) usando secado por atomización (SA) y liofilización (L) como métodos de encapsulación con la finalidad de proteger sus antocianinas frente a condiciones ambientales de una matriz alimenticia y del tracto gastrointestinal (TGI). Se utilizó como agente encapsulante (AE) una mezcla de polisacárido (maltodextrina (MD)) y proteína (aislado proteico de soya (APS)). Las condiciones experimentales óptimas para lograr una optimización de las variables respuesta (mediante metodología de superficie de respuesta) fueron una temperatura del aire de entrada al secador de 114°C y una relación JM/AE de 1:4,14. Esta relación JM/AE, se utilizó para replicar la formulación en la elaboración de micropartículas de JM por L.

El contenido de antocianinas totales (AT) de las micropartículas de SA y L fue 2,8 y 2,6 mg *ci-3-glu/g* respectivamente, alcanzando una eficiencia de encapsulación (EE) de AT superior a 92,5% en ambos métodos. La EE de las antocianinas diglicosiladas fue significativamente superior respecto a las monoglicosiladas para ambos métodos de microencapsulación. La recuperación de las micropartículas de SA fue superior (99,8%), respecto a L (91,8%), mientras que el rendimiento alcanzado usando L (94,6%) fue casi el doble del alcanzado por micropartículas SA (54,1%). Estas últimas tuvieron un mayor contenido de humedad y valores superiores de  $a_w$  y densidad aparente, respecto de L.

La encapsulación de JM favorecería la utilización de JM como un ingrediente en polvo, ya que al ser agregadas a un yogur, a los 35 d de almacenamiento a 4 °C, se alcanzaron altos porcentajes de retención de antocianinas individuales, destacando la *del-3-sa-5-glu* con la mayor retención en un rango de 90 – 99%. Adicionalmente, la microencapsulación aumentó la bioaccesibilidad (BA) de las antocianinas en un modelo de simulación GI *in vitro*, donde la BA de las AT fue significativamente superior para las micropartículas de JM (SA: 45,8%; L: 44,6%) respecto al JM (38,3%).

## Summary

### **“The encapsulation of maqui juice (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) by spray-drying and freeze drying: stability in food matrix and using an *in vitro* digestion model”**

Maqui juice (MJ) microparticles were prepared using both spray-drying (SD) and freeze-drying (FD) as encapsulation methods in order to protect anthocyanins against environmental conditions in a food matrix and into the gastrointestinal tract (GIT). A mixture of a polysaccharide (maltodextrin (MD)) and a protein (soy protein isolate(SPI)) was used as encapsulating agent (EA).

The optimal experimental conditions to achieve the optimization of the response variables (using response surface methodology) were an inlet air temperature of 114°C and a MJ/EA ratio of 1:4.14. This MJ/EA ratio was used to replicate the formulation in the preparation of MJ microparticles using FD.

The total anthocyanins (TA) content of the microparticles from SD and FD were 2.8 and 2.6 mg cy-3-glu/g respectively, achieving an encapsulation efficiency (EE) of TA higher than 92.5% in both methods. The EE of 3,5-O-diglycosylated anthocyanins was significantly higher than the EE of 3-O-glycosylated anthocyanins for both microencapsulation methods. The recovery of the anthocyanins from SD microparticles was higher (99.8%) in comparison to FD (91.8%) whereas the yield achieved using FD (94.6%) was almost the double than SD microparticles (54.1%). The SD microparticles have higher values of moisture content,  $a_w$  and bulk density in comparison to FD.

The MJ encapsulation would favor the use of MJ as a powder ingredient, because when the microparticles were added to a yogurt during 35 days of storage at 4°C, high retentions of individual anthocyanins were found where the del-3-sa-5-glu had the highest retention in a range of 90-99%. Moreover, the microencapsulation improved the bioaccessibility (BA) of the anthocyanins using a mimic GIT model *in vitro*, where the BA of TA of microparticles (SD: 45.8%, FD: 44.6%) was significantly higher than MJ (38.3%).

## Introducción

Durante las dos últimas décadas se ha generado un interés mundial en búsqueda de nuevas materias primas vegetales con altos contenidos de polifenoles y actividad antioxidante (Robert y Fredes, 2015), debido a los beneficios para la salud asociados a los polifenoles y su protección contra el daño producido por radicales libres y estrés oxidativo (Rice-Evans y Miller, 1996).

El maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) es una especie nativa de Chile, la que se ha estudiado especialmente por ser una fuente natural de antioxidantes, principalmente de antocianinas (Fredes *et al.*, 2014<sup>a</sup>), que además de ser responsables del color morado del fruto, están relacionadas con propiedades beneficiosas para la salud, tales como la regulación de la diabetes tipo II e inhibición de la lipasa pancreática (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014) y efectos cardioprotectores (Céspedes *et al.*, 2010). Sin embargo, la estabilidad de las antocianinas se ve afectada por distintos factores ambientales y del tracto gastrointestinal (TGI), como los cambios en el pH, la temperatura, oxígeno y la presencia de iones metálicos (Pascual-Teresa y Sanchez-Ballesta, 2008).

La encapsulación podría ser una estrategia de protección de las antocianinas, mejorando la estabilidad y bioaccesibilidad de estos compuestos (Fredes y Robert, 2014). La encapsulación mediante secado por atomización (SA) es el método más utilizado en la industria de alimentos para la encapsulación de antocianinas (Mahdavi y Jafari, 2014; Robert y Fredes, 2015), aunque en los últimos años se ha desarrollado también la encapsulación por liofilización (L) debido a que a diferencia del SA, se trabaja a temperaturas y presiones reducidas que disminuirían la degradación de sustancias volátiles o termosensibles (Robert *et al.*, 2017).

En este estudio se diseñaron micropartículas de jugo de maqui (JM) utilizando una mezcla de polisacárido (maltodextrina (MD))- proteína (aislado proteico de soya (APS)) como

agente encapsulante (AE), que otorgaría una mayor estabilidad de las micropartículas en una matriz alimenticia y protección de las antocianinas en el TGI, aumentando la bioaccesibilidad (BA) de éstas (Li y Tang, 2013).

El objetivo de esta investigación fue comparar el SA y la L como métodos de encapsulación de JM, analizando su efecto sobre el rendimiento, la recuperación y EE de antocianinas totales (AT) e individuales, incluyendo también el estudio de parámetros de reconstitución y estabilidad de las micropartículas en una matriz alimenticia y en un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*. Esta investigación se enmarcó en el proyecto FONDECYT Postdoctoral N° 3150342.

## Revisión bibliográfica

### 2.1. Maqui

La *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, conocida popularmente como maqui es una especie nativa de Chile, que crece preferentemente en suelos húmedos del valle central, en los faldeos de ambas cordilleras, quebradas o márgenes de bosques, desde el nivel del mar hasta los 2.500 m sobre el nivel del mar. El maqui se distribuye desde la Región de Coquimbo hasta Aysén (Rodríguez *et al.*, 1983).

El árbol de maqui es delgado, de 30 a 35 cm de diámetro, pudiendo alcanzar aproximadamente 5 m de altura (Benedetti, 2012). Tiene un período de floración desde octubre hasta principios de noviembre y un período de fructificación entre diciembre y febrero (Montenegro, 2002). Los frutos corresponden morfológicamente a una baya comestible de color “negro brillante”, de unos 5 mm de diámetro y de pulpa dulce en cuyo interior hay dos semillas angulosas (Hoffmann, 1997).

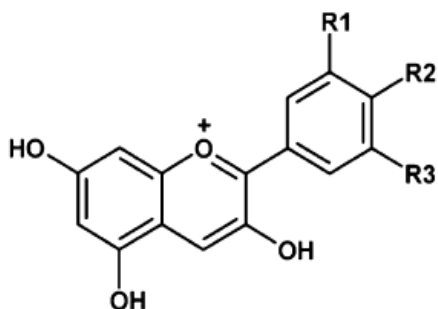
El maqui es un fruto que principalmente se recolecta de poblaciones silvestres y se comercializa en mercados locales tanto en fresco como procesado en productos de elaboración artesanal para consumo local. En los últimos años se ha potenciado el uso del maqui debido principalmente a sus propiedades antioxidantes, por lo que se han empezado a desarrollar diversos productos en base a éste, tales como jugos, mermeladas, maqui en polvo, cápsulas y productos de cosmética (Benedetti, 2012). La Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA, 2015) informó que las exportaciones de maqui alcanzaron US \$4,4 millones entre enero y septiembre de 2015. Aproximadamente 88.218 kg (US \$670.734) de maqui congelado fueron exportados durante este período. El maqui también se exportó como maqui en polvo, jugo, maqui deshidratado, en conserva y otros preparados de frutas. Los principales países de destino fueron Japón (25%), Corea del Sur (24%), Italia

(18%), Estados Unidos (16%), Alemania (9%), Australia (3%) y Dinamarca (2%), entre otros (ODEPA, 2015).

## **2.2. Antocianinas**

Las antocianinas son polifenoles que entregan al maqui su color característico, siendo estudiadas por su gran poder antioxidante y efectos beneficiosos para la salud (Pascual-Teresa y Sanchez-Ballesta, 2008).

Las antocianinas están constituidas por una antocianidina unida a uno o más azúcares en distintas posiciones. La estructura básica de una antocianidina es un ión flavilo (2-fenilbenzopirilio) (Figura 1) que varía de acuerdo al tipo de sustitución que tenga, teniendo grupos hidroxilos (OH) o metoxilos (OCH<sub>3</sub>) en distintas posiciones. Seis son las antocianidinas más comunes en plantas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina y malvidina (Wang *et al.*, 2013).



Fuente: Wang *et al.*, 2013.

**Figura 1. Estructura básica de una antocianidina.**

La identificación de las antocianinas del fruto de maqui se ha descrito por diferentes autores (Escribano-Bailón *et al.* 2006; Céspedes *et al.* 2010, Ruiz *et al.*, 2010; Fredes *et al.*, 2014<sup>b</sup>), siendo las principales:

1. Delphinidina-3-sambubiósido-5-glucósido (del-3-sa-5-glu)
2. Delphinidina-3,5-diglucósido (del-3,5-diglu)
3. Cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido (ci-3-sa-5-glu)
4. Cianidina-3,5-diglucósido (ci-3,5-diglu)

5. Delfinidina-3-sambubiósido (del-3-sa)
6. Delfinidina-3-glucósido (del-3-glu)
7. Cianidina-3-sambubiósido (ci-3-sa)
8. Cianidina-3-glucósido (ci-3-glu)

Escribano-Bailón *et al.* (2006) señalaron que la antocianina más abundante es la del-3-sa-5-glu (34% del total de las antocianinas), por otra parte Rojo *et al.* (2012) indicaron que la del-3-glu es la antocianina más abundante en el fruto de maqui (34,1% del total de antocianina). Fredes *et al.* (2014<sup>b</sup>), indicaron que tanto la del-3,5-diglu y del-3-glu fueron las antocianinas más abundantes en el fruto de maqui (33,7% y 31,6% del total de las antocianinas, respectivamente). Las variaciones encontradas tanto en el contenido como en el tipo de antocianinas se relacionan con diferencias en genotipos y/o en zonas geográficas de recolección (Fredes *et al.*, 2014<sup>b</sup>).

### **2.3. Estabilidad de antocianinas**

Debido a su estructura química en particular, las antocianinas son inestables y susceptibles a degradación, principalmente por factores ambientales (temperatura, luz y oxígeno) y otros factores como pH, presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, ácido ascórbico, azúcar, productos de degradación de proteínas y dióxido de azufre (Mahdavi y Jafari, 2014).

El oxígeno puede generar disminución del color o pardeamiento, ya sea formando compuestos oxidados que reaccionan con las antocianinas o una oxidación directa de éstas (Rein, 2005). La degradación de las antocianinas generada por la luz se relaciona con la aceleración de reacciones fotoquímicas, en la cual se pueden encontrar compuestos incoloros (Eiro y Heinonen, 2002).

La aplicación de tratamientos con temperaturas altas afecta negativamente el contenido de antocianinas, donde un tratamiento con temperatura entre 42°C y 48°C por tres horas redujo el contenido de antocianinas en frutillas (Civello *et al.*, 1997).



La biodisponibilidad de las antocianinas es baja debido a su sensibilidad a los cambios en pH. Las antocianinas son generalmente estables a valores de pH menores o iguales a 3,5 y son por lo tanto, estables en condiciones gástricas. Sin embargo, se degradan a valores de pH más altos, como el del intestino (pH 6-7) (Mahdavi y Jafari, 2014).

En este contexto, se plantea la encapsulación de las antocianinas del JM como una estrategia de protección frente a las condiciones ambientales del alimento y del sistema gastrointestinal.

#### **2.4. Microencapsulación**

La microencapsulación es una técnica que se ha utilizado en la industria de alimentos y se define como una tecnología donde compuestos sólidos, líquidos o gaseosos 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 su liberación controlada bajo condiciones específicas (Desai y Park, 2005).

La selección del proceso de encapsulación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades físicas y químicas del AE y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Yáñez *et al.*, 2002).

Existen diferentes métodos de microencapsulación. Según Yáñez *et al.* (2002) se dividen en tres grupos:

- i. Procesos físicos: secado por atomización, extrusión y recubrimiento por aspersion.
- ii. Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
- iii. Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

Adicionalmente, Desai y Park (2005) destacan otros métodos de encapsulación como el secado por enfriamiento (spray-cooling), secado por refrigeración (spray-chilling), recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión centrífuga y liofilización entre otros.

#### A. Secado por atomización (SA)

El SA es el método más utilizado en la industria de alimentos para la encapsulación de antocianinas, ya que comparado con otros métodos de encapsulación, el SA permite obtener micropartículas en polvo, en un proceso de un solo paso (Yáñez *et al.*, 2002). Además, es un método económico, efectivo en la protección de ingredientes alimentarios susceptibles al deterioro por agentes externos (Tonon *et al.*, 2010) y es un equipo disponible comúnmente en la industria de alimentos y farmacéutica (Robert y Fredes, 2015).

El SA es una operación unitaria donde un producto líquido es atomizado en una corriente de gas caliente, obteniendo instantáneamente un polvo (Gharsallaoui *et al.*, 2007). El proceso de SA comprende tres fases principales. La primera de ellas es la atomización del líquido de alimentación mediante un dispositivo apropiado. En la segunda etapa, finas gotitas de la alimentación son sometidas a la interacción con un gas de secado (generalmente aire) a alta temperatura, donde se produce transferencia de calor y masa (agua), dando lugar a la formación de partículas de producto sólido. Durante la última fase, las partículas secas se separan del gas de secado en un ciclón. Cada una de las fases antes mencionadas, así como las condiciones en las que se llevan a cabo, tiene un efecto significativo en la eficacia del proceso de secado y las propiedades del producto final (Cal y Sollohub, 2010).

Las variables de operación más importantes en la microencapsulación por SA son la temperatura de alimentación y la temperatura de entrada y salida del aire del secador, mientras que el tipo de AE y su relación con el extracto a encapsular son las principales variables de formulación (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

## B. Liofilización (L)

La encapsulación por L es un proceso de conservación de alimentos (incluyendo sus compuestos activos) sensibles al calor y otros materiales biológicos. Se basa en la sublimación del agua, conservando con éxito la mayor parte de las propiedades iniciales de las materias primas; tales como la forma, las dimensiones, color, sabor, textura y la actividad biológica (Ceballos *et al.*, 2012).

La principal ventaja de esta técnica de deshidratación y encapsulación es la alta calidad del producto terminado. Sin embargo, dado el costo del proceso, la L permanece generalmente restringida (Amrani y Brigui, 2007). Se considera un método adecuado para el secado de pigmentos térmicamente sensibles tales como las antocianinas (Laokuldilok y Kanha, 2015), donde además, el producto obtenido tiene una buena capacidad de rehidratación (Ceballos *et al.*, 2012).

El proceso de L consta principalmente de dos pasos; el primero consiste en congelar el producto y en el segundo paso el producto congelado es secado por sublimación del hielo bajo presión (Orrego, 2008). Los parámetros de operación más importantes en la L son la temperatura de congelamiento, la presión total y parcial del sistema, considerando también el tipo de equipo que se utilice, además de las propiedades del alimento que se liofilizará (Parzanese, 2015).

La etapa de congelación tiene una gran influencia en la eficiencia global del proceso de L, ya que establece la estructura de los cristales de hielo (forma y tamaño) que afectan la velocidad de transferencia de calor y masa, afectando así la posterior sublimación y también las propiedades de rehidratación del polvo (Ceballos *et al.*, 2012).

La L, a diferencia del SA, requiere un paso de molienda o trituración para la obtención de productos en polvo. En el proceso de trituración se reduce el tamaño del producto, mediante

una acción mecánica. La energía necesaria depende de la dureza del sólido así como también de su fragilidad. La fuerza aplicada puede ser de compresión, impacto o cizalla, y tanto la magnitud de la fuerza como el tiempo de aplicación afectarán el tamaño de partícula alcanzado (Earle, 1968).

Dentro de los equipos de molienda ampliamente utilizados en la industria de alimentos, destacan las quebrantadoras de mandíbulas, quebrantadoras de cilindros, molinos de martillos, molinos de eje fijo, molinos de placa, molinos de rodillos, molinos de bolas y cortadoras entre otros (Earle, 1968). La compresión es la acción característica de los quebrantadores. Los molinos utilizan impacto y frotación, a veces combinadas con compresión; los molinos de ultrafinos operan principalmente por frotación y el corte es, lógicamente, la acción característica de las máquinas cortadoras (McCabe *et al.*, 1991). Para realizar la disminución del tamaño de partículas del producto de L a nivel de laboratorio se simula la acción de los equipos utilizados en la industria.

La reducción del tamaño de partículas aumenta también la reactividad de los sólidos (McCabe *et al.*, 1991) lo que podría afectar directamente las características morfológicas del polvo obtenido y sus propiedades de reconstitución, rehidratación y estabilidad. En este estudio, se seleccionó un mortero de cerámica, el cual simula la acción de un molino y un molinillo para café, que realiza una acción de corte, como las máquinas cortadoras.

## **2.5. Agentes encapsulantes (AE)**

La elección del AE es muy importante para lograr una buena eficiencia de encapsulación (EE) y estabilidad de las micropartículas. Los criterios para la selección de un AE se basan principalmente en las propiedades físicas y químicas de los polímeros; tales como, la solubilidad; peso molecular; temperatura de transición vítrea/fusión; cristalinidad; difusibilidad; capacidad de formación de película y propiedades emulsionantes (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Los AE utilizados normalmente en el secado por atomización de jugos de frutas ricas en antocianinas son MD y goma arábica debido a su alta solubilidad y baja viscosidad, lo que permite un alto contenido de sólidos en la solución de alimentación. La MD destaca como el principal AE en extractos de jugos de frutas tipo *berry* (Robert y Fredes, 2015).

Las MD son almidones hidrolizados, utilizados de manera eficiente como AE en el secado por atomización para proteger materiales sensibles frente a la oxidación y también evitan problemas de cristalización, lo cual es especialmente importante en el caso de los productos ricos en azúcar como los jugos de frutas (Tonon *et al.*, 2010). Adicionalmente, MD de diferentes equivalentes de dextrosa (12-20) son comúnmente utilizadas por su alta solubilidad en agua, baja viscosidad, bajo contenido de azúcar y por generar soluciones incoloras (Robert *et al.*, 2010).

La proteína de soya es una de las fuentes de proteínas vegetales más populares utilizada como ingrediente en la formulación de alimentos (FAO, 1992). Los APS son la forma más concentrada de productos de proteína de soya disponibles comercialmente y contienen más de 90% de proteína, sobre una base libre de humedad (FAO, 1992). Las propiedades funcionales de los aislados de soya han sido asociadas con el comportamiento hidrodinámico, así como también con las interacciones proteína-proteína que se reflejan en su composición y en la estructura de sus componentes principales, las globulinas glicina (11S) y  $\beta$ -conglucina (7S) (Wagner *et al.*, 2000).

Kim y Morr (1996) utilizaron el APS como AE, obteniendo como resultado buenas propiedades en las micropartículas del aceite de naranja y mayor retención de éste en relación a la encapsulación con proteína de suero de leche y goma arábica. Robert *et al.* (2015) encapsularon pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) con MD, inulina, APS y mezclas de proteínas y polisacáridos como AE. Los resultados mostraron que las mezclas

proteínas-polisacáridos mejoraron la eficiencia de encapsulación de polifenoles respecto a los sistemas con polisacáridos.

Una de las limitaciones que existe en el uso de proteínas como AE es su alta viscosidad, por lo que es reconocido que la unión de proteínas con polisacáridos de baja viscosidad puede generar una disminución de ésta, aumentar la EE e incluso otras propiedades físicas de los polvos obtenidos por SA (Young *et al.*, 1993). Adicionalmente, Li y Tang (2013) estudiaron la influencia de la glicación en las propiedades de microencapsulación en emulsiones de APS y lactosa secadas por atomización, obteniendo como resultados que la incorporación del polisacárido al sistema aumenta la estabilidad de la emulsión, la solubilidad de la proteína y la EE.

En esta investigación se utilizó una mezcla de proteína (APS) con polisacárido (MD) como AE para la microencapsulación de JM por SA y L.

## **2.6. Reconstitución del JM**

Una propiedad importante en el desarrollo de formulaciones alimenticias en polvo, es la facilidad de reconstituirlas en agua (Ceballos *et al.*, 2012). La rehidratación se influencia por los mecanismos de transferencia de materia, donde se consideran los factores propios del proceso de deshidratación (pre tratamiento, método de secado, temperatura y velocidad de secado y almacenamiento) y las condiciones de rehidratación a utilizar, tales como el solvente que se empleará, la temperatura a la que se realizará el proceso, la agitación y también a las características intrínsecas del producto seco (Marín *et al.*, 2006).

Finalmente el producto reconstituido se podrá evaluar de acuerdo a su habilidad para humectarse, la capacidad para sumergirse, la agilidad para dispersarse en partículas independientes en el solvente (dispersabilidad) y su solubilidad (Mosquera, 2010).

## **2.7. Estabilidad de antocianinas en matriz alimenticia**

El uso de polisacáridos como la MD para la protección de antocianinas microencapsuladas está limitado por su solubilidad en agua y la subsiguiente liberación de antocianinas en medios líquidos, lo cual afecta directamente su estabilidad cuando son aplicadas en alimentos líquidos tales como productos lácteos (Robert y Fredes, 2015). Robert *et al.* (2010) estudiaron la adición de micropartículas de jugo de granada en yogur, mostrando que las antocianinas encapsuladas tanto con MD como con APS tuvieron un comportamiento similar a aquellas no encapsuladas (jugo de granada), desapareciendo antes de 7 d de almacenamiento. Estos resultados fueron consistentes con Coisson *et al.* (2005) que estudió la adición de jugo de acaí en yogur, donde las antocianinas fueron estables por 2 d. Por esta razón se ha comenzado a investigar la efectividad de uso de polisacárido en mezcla con proteínas como AE para mejorar las propiedades físicas y químicas de las micropartículas y su estabilidad (Li y Tang, 2013).

La adición de extractos de antocianinas en diferentes etapas del proceso de elaboración de yogur se ha estudiado para jugo de acaí (*Euterpe oleracea*) (Coisson *et al.*, 2005), cheqche liofilizado (*Berberis boliviana*) (Wallace y Giustu, 2008), extractos etanólicos de vino de uva (*Vitis vinifera*) (Karaaslan *et al.*, 2011) y grosella negra (*Ribes nigrum*) (Sun-waterhouse *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen estudios que analicen la estabilidad de antocianinas totales (AT) e individuales de maqui aplicada en yogur, ni tampoco la efectividad de la utilización de la microencapsulación como método de protección de éstas en una matriz alimenticia.

## **2.8. Modelo de simulación gastrointestinal *in vitro***

Las condiciones del tracto gastrointestinal (TGI), afectan la estabilidad de las antocianinas y por lo tanto su biodisponibilidad como su bioaccesibilidad (BA).

La BA se define como la cantidad o fracción del compuesto bioactivo que es liberado de la matriz alimenticia en el TGI y es potencialmente disponible para la absorción (Heaney, 2001 citado por Carbonell-Capella *et al.*, 2014). La BA depende ampliamente de las interacciones de los compuestos bioactivos con la matriz alimenticia (Aravena *et al.*, 2016) y generalmente se evalúa mediante un modelo de digestión *in vitro*, en el cual se simula la digestión gástrica y del intestino delgado (Carbonell-Capella *et al.*, 2014). De acuerdo con la muestra a digerir, se ajustan variables como el pH, la actividad enzimática y la concentración de enzimas entre otras (Hur *et al.*, 2011).

Por otra parte, la biodisponibilidad es un concepto que es definido como la fracción de un nutriente o compuesto ingerido que alcanza la circulación sistémica y ejerce su efecto en el organismo (Carbonell-Capella *et al.* 2014).

Por lo tanto, para cuantificar la protección que brinda el AE al compuesto activo, en algunos estudios de microencapsulación (Oidtmann *et al.* 2012; Flores *et al.* 2014), se compara la BA de los compuestos de interés sin y con encapsular.



## **Hipótesis**

La microencapsulación de antocianinas de JM depende de las características estructurales de éstas y del método de encapsulación, afectando directamente la EE y la estabilidad. Las micropartículas obtenidas mediante SA tendrán un menor rendimiento y recuperación de antocianinas que las elaboradas por L, mientras que la estabilidad de las micropartículas obtenidas por L será menor que las del SA, por sus diferencias morfológicas e higroscópicas.

## Objetivos

### **4.1. Objetivo general**

Comparar el SA y la L como métodos de encapsulación de JM, sobre el rendimiento, la recuperación y EE de antocianinas, así como también la reconstitución, estabilidad de las micropartículas en una matriz alimenticia y en un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*.

### **4.2. Objetivos específicos**

1. Estudiar la encapsulación de JM por SA, mediante un diseño estadístico que involucre condiciones de formulación y proceso aplicando la metodología de superficie respuesta (MSR).
2. Caracterizar física, química y morfológicamente las micropartículas obtenidas por SA bajo condiciones óptimas y micropartículas obtenidas por L.
3. Estudiar las propiedades de reconstitución de micropartículas de JM.
4. Analizar la influencia de una matriz alimenticia sobre la estabilidad de las antocianinas de JM microencapsuladas por SA y L.
5. Estudiar la estabilidad de las micropartículas en un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*.

## **Materiales y métodos**

### **5.1. Materiales**

- Jugo concentrado de maqui orgánico (JM) (65 °Brix, Patagonol™ – LE, Bayas del Sur, Purranque, Chile).
- Agentes encapsulantes (AE):
  - Maltodextrina (MD): Maltodextrina 1520 (Prinal S.A, Santiago, Chile).
  - Aislado Proteico de Soya (APS): Proteína HS (Proteína aislada de soya, proteína Min. 88%, Prinal S.A, Santiago, Chile).
- Cianidina-3-glucósido (ci-3-glu) (Sigma Aldrich, Estados Unidos).
- Yogur natural batido (SOPROLE, Chile).
- Set enzimas digestivas y sales biliares:
  - $\alpha$ -amilasa 300 – 1000 U/mg proteína, A1031-5KU (Sigma Aldrich, Estados Unidos).
  - Pepsina de mucosa gástrica porcina  $\geq$  250 U/mg sólidos, P7000-100G (Sigma Aldrich, Estados Unidos).
  - Pancreatina 4 x USP, P1750 – 100G (Sigma Aldrich, Estados Unidos).
  - Extracto de bilis porcina, B8631 – 100G (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

### **5.2. Metodología**

**5.2.1. Estudio de la encapsulación de JM por SA, mediante un diseño estadístico que involucra condiciones de formulación y proceso aplicando MSR.**

*5.2.1.1. Caracterización de JM por análisis físicos y químicos.*

**a. Humedad, sólidos solubles, pH y acidez:** Se determinaron de acuerdo a los métodos descritos por la AOAC (AOAC, 1996).

**b. Azúcares totales:** Se determinó a través del método de Antrona (Osborne y Voogt, 1986), utilizando un espectrofotómetro UV3 UV/Vis UNICAM (Rochester, Estados Unidos), a una longitud de onda de 620 nm. Los resultados se expresaron como mg glucosa/mL de peso fresco (PF) de acuerdo a una curva de calibración (0,05 mg glucosa/mL – 0,15 mg glucosa/mL,  $R^2= 0,999$ ) (Anexo 1).

**c. Cuantificación de AT por espectrofotometría:** Se determinó por el método de pH diferencial (Lee *et al.*, 2005) mediante un espectrofotómetro UV3 UV/Vis UNICAM (Rochester, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como mg de cianidina-3-glucósido por gramo (mg ci-3-glu/g PF), utilizando un peso molecular de 449 g/mol y un coeficiente de extinción molar de 26.900 L/ cm·mol

**d. Cuantificación de AT y AT individuales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):** La identificación y cuantificación de AT y AT individuales se realizó de acuerdo a Fredes *et al.* (2014<sup>b</sup>), utilizando un HPLC con detector con arreglo de diodo (DAD) (Flexar, Perkin Elmer, Inglaterra) y una columna C18 (5  $\mu$ m x 4.6 mm i.d. x 25 cm, Symmetry, Waters, Irlanda). Las fases móviles utilizadas fueron ácido fórmico al 5% (A) y metanol 100% (B), de acuerdo al método descrito por Fredes *et al.* (2014<sup>b</sup>) con modificaciones en el tiempo de análisis. De acuerdo a las áreas de los *peaks* registrados a 520 nm, los resultados se expresaron como mg de ci-3-glu por gramo PF, obtenidos a partir de una curva de calibración (1,6•10<sup>-4</sup> mg de ci-3-glu/mL – 2,5 •10<sup>-2</sup> mg de ci-3-glu/mL,  $R^2= 0,9997$ ) (Anexo 2). Las muestras para HPLC fueron inyectadas en duplicado para lo cual el JM fue diluido a 20 °Brix con agua para cromatografía LiChrosolv® (grado LC-MS, Merck-Milipore) y se filtró a través de un filtro de membrana politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22  $\mu$ m (VWR Internacional, Atlanta, GA, Estados Unidos).

**e. Polifenoles totales (PT):** Se determinó por el método de Folin Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), utilizando un espectrofotómetro UV3 UV/Vis ATI UNICAM (Rochester, Estados Unidos) a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g PF, de acuerdo a una curva de calibración (202,4 ug ácido gálico/mL – 607,2 ug ácido gálico/mL,  $R^2=0,9987$ ) (Anexo 3).

**f. Capacidad antioxidante (CA):** Se determinó mediante el método de poder antioxidante de la reducción del ión férrico (FRAP) y por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). El método FRAP se realizó de acuerdo a Benzie y Strain (1996), donde los resultados se expresaron como milimoles equivalentes de  $Fe^{+2}$  por gramo de PF (mmol E  $Fe^{+2}$ /g PF), de acuerdo a una curva de calibración de ecuación  $1,2 \text{ mmol } Fe^{+2}/mL - 3 \text{ mmol } Fe^{+2}/mL$ ,  $R^2=0,9929$ ) (Anexo 4). El método del radical DPPH se realizó de acuerdo a Brand-Williams *et al.* (1995) y los resultados se expresaron como  $EC_{50}$  (miligramos de muestra que decolora el 50% de la solución etanólica de DPPH) mediante la construcción de una curva para cada muestra (Anexo 5).

*5.2.1.2. Estudio de la encapsulación de JM por SA mediante un diseño estadístico que involucra condiciones de formulación y proceso.*

**a. Preparación de las micropartículas:** La encapsulación de JM con MD y APS (MD: APS 2:1 p/p) se realizó por secado por atomización. El APS (1,32-5,32 g) se incorporó en agua destilada a 40°C, utilizando un agitador magnético (1000 - 1500 rpm), posteriormente se sonicó por 5 min, se enfrió a 20°C y se agregó la MD (2,64 – 10,73 g). La mezcla se dejó 12 h con agitación y finalmente se agregó el JM (2,5 g). La solución resultante (100 g) se homogeneizó con un Polytron PT 2100 (Kinematica A.G, Suiza) a 15.000 rpm por 5 min, y se alimentó a un mini spray-dryer B290 (Buchi, Flawi, Suiza), manteniendo agitación constante. Las condiciones del equipo fueron una temperatura de entrada del aire en un

rango entre 120 y 180°C  $\pm$ 1 °C, un flujo de aire de 600 L/h, una velocidad de alimentación de 1 mL/min y una presión de atomización de 0,14 MPa.

Las micropartículas se almacenaron a -80°C protegidas de la luz, para su posterior análisis.

**b. Diseño experimental:** 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 el sistema estudiado (JM/MD:APS). Las variables independientes fueron la relación JM/AE (X1) (1:2- 1:6) y la temperatura de entrada del aire al secador (X2) (120°C- 180°C), cuyos rangos fueron definidos de acuerdo a pruebas preliminares. Las variables dependientes o respuesta correspondieron a la EE de AT y AT individuales, recuperación de antocianinas y rendimiento del proceso. Para la optimización se utilizó la 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.

**c. Contenido de AT en las micropartículas:** Muestras de micropartículas (200 mg) se disolvieron en 2 mL de una solución de metanol:ácido acético:agua (50:1:49 % v/v/v), con agitación en vortex por 1 min. Posteriormente la solución se sonicó por 20 min, se centrifugó a 4000 rpm por 8 min, y el sobrenadante se filtró (PTFE de 0,22  $\mu$ m). El contenido de AT se determinó por el método de pH diferencial (Lee *et al.*, 2005) y por HPLC (Fredes *et al.*, 2014<sup>b</sup>). La cuantificación de antocianinas individuales se realizó por HPLC (Anexo 2).

**d. Contenido de antocianinas superficiales en las micropartículas:** Muestras de micropartículas (400 mg) se dispersaron en una solución de metanol:ácido acético (99:1 %v/v), con agitación suave durante 1 min. Posteriormente, la solución se centrifugó a 1000 rpm por 2 min, y el sobrenadante se filtró utilizando un filtro PTFE de 0,22  $\mu$ m. El contenido de AT superficiales se determinó por el método de pH diferencial (Lee *et al.*, 2005) y por

HPLC (Fredes *et al.*, 2014<sup>b</sup>). La cuantificación de antocianinas individuales se realizó por HPLC (Anexo 2).

**e. Eficiencia de encapsulación, recuperación de antocianinas y rendimiento:** Se determinaron de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$EE (\%) = \frac{\text{antocianinas totales (mg/g)} - \text{antocianinas superficiales(mg/g)}}{\text{antocianinas totales (mg/g)}} \times 100$$

$$EE_i (\%) = \frac{\text{antocianina}_i \text{ total (mg/g)} - \text{antocianina}_i \text{ superficial (mg/g)}}{\text{antocianina}_i \text{ total (mg/g)}} \times 100$$

$$\text{Recuperación}(\%) = \frac{\text{antocianinas totales (mg/g)}}{\text{antocianinas teóricas (mg/g)}} \times 100$$

$$\text{Recuperación individual}(\%) = \frac{\text{antocianina}_i \text{ total (mg/g)}}{\text{antocianina}_i \text{ teórica (mg/g)}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{micropartículas obtenidas en el secado (g)}}{\text{sólidos totales de la solución de alimentación (g)}} \times 100$$

Donde el subíndice *i* corresponde a las antocianinas individuales cuantificadas en el JM y micropartículas.

#### 5.2.1.3. Preparación de micropartículas de JM obtenidas por L.

Se realizó una mezcla de JM y AE (MD:APS 2:1) de acuerdo a la relación óptima de JM/AE obtenida para SA. La solución se congeló a -80°C por un mínimo de 48 h y luego se secó en un liofilizador LABCONCO (LABCONCO Corporation, Kansas City, Missouri, Estados Unidos), a una presión bajo 0,04 mBar entre 48 - 72 h y una temperatura de -53,0 ± 1,7 °C. El producto seco resultante se molió con un molinillo de café (LA) MKM6003 (Bosch, Alemania) o mortero de porcelana (LB). Para el estudio de morfología de las micropartículas

se utilizó como control el producto seco sin molienda. Las micropartículas se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### **5.2.2. Caracterización física, química y morfológica de las micropartículas obtenidas por SA bajo condiciones óptimas y micropartículas obtenidas por L.**

**a. Contenido de AT y AT individuales, contenido de antocianinas superficiales e individuales, EE y recuperación:** Estos análisis fueron realizados como se describió en el objetivo 1.

**b. Humedad y actividad de agua ( $a_w$ ):** Se realizaron de acuerdo a AOAC (1996).

**c. Higroscopicidad:** Se determinó de acuerdo al método descrito por Cai y Corke (2000).

**d. Densidad aparente:** Se determinó siguiendo el método de Laokuldilok y Kanha (2015). Se agregó una muestra de micropartículas en una probeta de 10 mL hasta su aforo, registrando su peso. A continuación se utilizó el peso y volumen de la muestra para calcular la densidad aparente, expresada como g/mL.

**e. Morfología de las micropartículas:** La estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron cubiertas con un film de 10 nm de oro/paladio utilizando un equipo Sputter Coater 108auto con un controlador de espesor MTM-20 y analizadas con un microscopio SEM de alta resolución (HR) con un detector de electrones secundario (SED) (INSPECT-F50, FEI, Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, Oregon, Estados Unidos) operado a 5.00 KV.



**f. Tamaño de partícula:** El tamaño de las partículas se midió mediante difracción de luz de un láser He-Ne de 600 nm en un equipo MastersizerX (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las muestras se dispersaron en isopropanol y sonicaron por 20 seg. en una cantidad suficiente para alcanzar una obscuración óptima en el equipo. El resultado se obtuvo del promedio de al menos 40 mediciones por muestra.

### 5.2.3. Estudio de propiedades de reconstitución de micropartículas de JM.

**a. Solubilidad:** Se determinó de acuerdo a los métodos descritos por Laokuldilok y Kanha (2015). Las micropartículas de JM (1,0 g) fueron disueltas en 10 mL de agua destilada, la solución se agitó continuamente durante 30 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se secó a 105°C por 24 h para determinar su peso seco. La solubilidad fue expresada como porcentaje (%).

**b. Dispersabilidad:** Se determinó de acuerdo al método descrito por Laokuldilok y Kanha (2015). Las micropartículas de JM (1,0 g) fueron disueltas en 10 mL de agua destilada, y la suspensión se agitó en un agitador magnético durante 25 seg. El polvo reconstituido se pasó a través de un tamiz de 150 mm. Una muestra de 1,0 mL de la solución tamizada fue transferida a una cápsula de aluminio y se secó a 105°C durante 4 h. Se utilizó el total de sólidos como un porcentaje para el cálculo de la dispersabilidad, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Dispersabilidad (\%)} = \frac{(10+a)*TS}{a*(100-\frac{b}{100})}$$

Donde:

TS (%): muestra seca que pasa a través del tamiz

a (g): cantidad de micropartículas de JM utilizado

b (%): contenido de humedad de las micropartículas de JM.

c. **Contenido de AT y pH:** fueron determinados de acuerdo a métodos descritos anteriormente.

#### **5.2.4. Análisis de la influencia de una matriz alimenticia sobre la estabilidad de las antocianinas de JM microencapsuladas por SA y L.**

Muestras de micropartículas de JM (0,25 g) obtenidas bajo condiciones óptimas fueron adicionadas a 25 g de yogur natural Soprole (Anexo 6) en frascos de vidrios de 28 mL con tapa. Adicionalmente, se preparó una muestra control con 0,25 g de JM (65°Brix). Las muestras se almacenaron a  $5 \pm 1$  °C en ausencia de luz. La cuantificación de las antocianinas se realizó cada 7 d durante 5 semanas de acuerdo a la metodología descrita por Coisson *et al.* (2005). Para esto, el yogur con JM (5 g) y yogur con micropartículas (7 g), se mezclaron con agua para cromatografía LiChrosolv® (grado LC-MS, Merck-Milipore) a pH=3 hasta alcanzar 10 g. Cada muestra se agitó intensamente durante 1 min, y se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue centrifugado a 12000 rpm por 20 min. La cuantificación de AT se realizó mediante pH diferencial y HPLC, y las antocianinas individuales por HPLC, determinando la retención(%) como la proporción del contenido de antocianina en el momento específico y el contenido de antocianina inicial antes del almacenamiento. Siguiendo trabajos previos (Brauch *et al.*, 2015; Giusti y Wrolstad, 1996), se utilizaron cinéticas de degradación de primer orden para ajustar los datos analíticos y calcular las constantes de velocidad de degradación (k), para posteriormente determinar la vida media ( $t_{1/2} = \ln 2/k$ ), la cual indica el tiempo necesario para que la concentración inicial de antocianinas disminuya a la mitad.

### 5.2.5. Estudio de estabilidad de antocianinas en micropartículas de JM en un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*

El estudio de estabilidad se realizó de acuerdo al método descrito por Aravena *et al.* (2016), simulando la digestión bucal, gástrica e intestinal duodenal.

- a. **Digestión bucal.** Se pesaron 5 g de micropartículas (SA y L) y se incorporó 9 mL de saliva artificial, conformada por bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 14,4 mM, cloruro de potasio (KCl) 21,1 mM, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1,59 mM y cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 0,2 mM, ajustando el pH de las muestras a 7 con HCL 1N. Posteriormente, se agregó la enzima  $\alpha$ -amilasa a la solución, incorporando 60 unidades por mL de tampón el mismo día en que se realizó el ensayo. Finalmente, las soluciones fueron incubadas en un baño termostático (Zhicheng ZHWY – 110X30) durante 5 min a 37°C y con una agitación de 185 rpm.
- b. **Digestión gástrica.** El pH de las muestras se ajustó a 2 utilizando HCL 1N y se agregó 36 mL de una solución de pepsina (25 mg/mL en HCl 0,02 N), por lo tanto, cada muestra (que contenía 9 mL de saliva artificial) se diluyó 5 veces con jugo gástrico artificial, como ocurre en el estómago (Boyland y Walker, 1974). Una vez realizada la incorporación de la enzima, se incubó por 2 h a una temperatura de 37°C y con agitación de 130 rpm.
- c. **Digestión duodenal.** El pH de las muestras se ajustó a 6,0 con  $\text{NaHCO}_3$  1M, luego por cada mL de muestra se añadieron 0,25 mL de una solución intestinal artificial, la cual contenía pancreatina (2g/L) y sales biliares (12 g/L) disueltos en  $\text{NaHCO}_3$  acuoso (0,1M). La incubación se realizó durante 2 h a 37 °C y con agitación de 45 rpm.

Posteriormente, los productos de digestión fueron traspasados a tubos Falcon de 50 mL y el pH fue ajustado a 3 (Oidtmann *et al.* 2012). Las soluciones se centrifugaron a 5000 rpm

por 10 min para recuperar la fracción líquida, descartando la masa no digerida restante (pellet). El producto de digestión líquido se centrifugó a 12.000 rpm para su posterior análisis de antocianinas. Adicionalmente, se analizó el contenido de antocianinas en los pellets.

El contenido de AT y AT individuales correspondió a la porción bioaccesible (BA), es decir, la cantidad de antocianinas que se libera de la matriz, después de la digestión, reflejando su potencial de biodisponibilidad (Lila et al. 2012).

La BA de las antocianinas individuales del JM y cada polvo se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$BA (\%) = \frac{\text{mg antocianina}_i \text{ en producto de digestión}}{\text{mg antocianina}_i \text{ en JM o micropartículas}} \times 100$$

En la cual el subíndice *i* corresponde a cada una de las antocianinas cuantificadas en el JM y en las micropartículas.

### **Análisis Estadístico**

Los resultados de la caracterización de las micropartículas, propiedades de reconstitución, y estabilidad fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó análisis de la varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95% para evaluar la existencia de diferencias significativas entre las muestras de micropartículas. Cuando se encontraron diferencias significativas, se utilizó la prueba de comparación múltiple Tukey HSD. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I (Statpoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, Estados Unidos).

## Resultados y discusión

### 6.1. Estudio de la encapsulación del JM por SA, mediante un diseño estadístico que involucre condiciones de formulación y proceso aplicando la MSR.

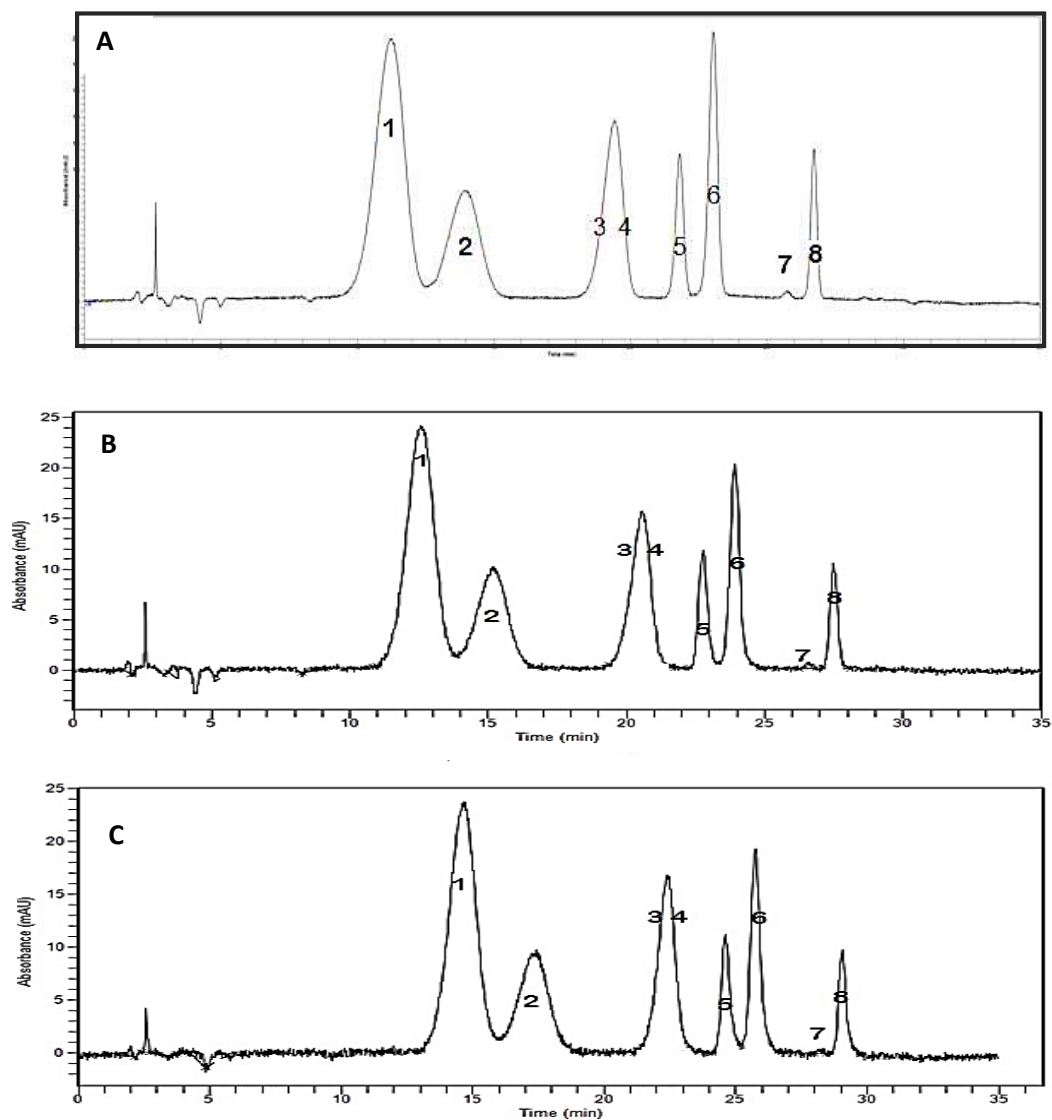
#### 6.1.1. Caracterización del JM

Los resultados de pH ( $3,7 \pm 0,0$ ), acidez titulable ( $5,8 \pm 0,1\%$  ácido cítrico), densidad ( $1,3 \pm 0,1$  g/mL), sólidos solubles ( $65,6 \pm 0,2^\circ$ Brix a  $20^\circ\text{C}$ ) y azúcares totales ( $56,8 \pm 0,7\%$  glucosa) del JM fueron similares a los descritos por la ficha técnica del producto (Anexo 7) ya que no existen otros antecedentes que caractericen este tipo de jugo. Es importante considerar que el alto contenido de sólidos solubles puede ser atribuido a la gran cantidad de azúcares totales del JM.

El contenido de polifenoles totales (PT) del JM ( $29,3$  mg EAG/g PF) fue menor a lo informado por Miranda-Rottmann *et al.* (2002) para un jugo concentrado similar, mientras que fue mayor a los descritos por Rubilar *et al.* (2011) y Fredes *et al.* (2014<sup>b</sup>). Las diferencias entre estos valores se pueden atribuir a que los JM provienen de diferentes genotipos y/o zonas geográficas (Fredes *et al.* 2014<sup>b</sup>). Adicionalmente, el contenido de PT en frutos puede estar influenciado por el estado de madurez al momento de la cosecha del fruto (Fredes *et al.*, 2012; González *et al.*, 2015) y las condiciones de almacenamiento y procesamiento para la obtención del JM (Brauch *et al.*, 2015; González *et al.*, 2015; Brauch *et al.*, 2016). La capacidad antioxidante (CA) por el método FRAP fue de  $0,65$  mmol E  $\text{Fe}^{+2}$ /g PF y el  $\text{EC}_{50}$  de  $0,15$  mg PF. Estos valores son superiores a los descritos por Fredes *et al.* (2014<sup>b</sup>) para diferentes genotipos de maqui, por lo tanto el JM analizado tendría una mayor CA.

El contenido de antocianinas totales (AT) por el método de pH diferencial fue de  $13,8 \pm 0,1$  mg ci-3-glu/g y por HPLC fue de  $15,9 \pm 0,1$  mg ci-3-glu/g JM, valores que coinciden con lo informado en la ficha técnica. Estos valores fueron similares a los descritos por Fredes *et al.* (2014<sup>b</sup>).

El perfil de antocianinas del JM indicó la presencia de ocho antocianinas (Figura 2A), sin embargo la ci-3-sa se encontró bajo el límite de cuantificación (0,048  $\mu\text{g/mL}$ ) para este estudio.



**Figura 2. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD del perfil de antocianinas a 520 nm. A: JM; B: micropartículas de JM obtenidas por SA; C: micropartículas de JM obtenidas por L. Peaks: 1: delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido (del-3-sa-5-glu); 2: delfinidina-3,5-diglucósido (del-3,5-diglu); 3 4: cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido + cianidina-3,5-diglucósido (ci-3-sa-5-glu + ci-3,5-diglu); 5: delfinidina-3-sambubiósido (del-3-sa); 6: delfinidina-3-glucósido (del-3-glu); 7: cianidina-3-sambubiósido (ci-3-sa) y 8: cianidina-3-glucósido (ci-3-glu).**

La Tabla 1 indica el contenido de antocianinas individuales cuantificadas como mg ci-3-glu/g JM y el porcentaje respecto a las AT.

**Tabla 1. Contenido de antocianinas del JM**

	mg ci-3-glu/g	%
Del-3-sa-5-glu	6,3 ± 0,02	39,5 ± 0,01
Del-3,5-diglu	2,7 ± 0,01	17,0 ± 0,01
Ci-3-sa-5-glu + ci-3,5-diglu	2,9 ± 0,01	18,4 ± 0,01
Del-3-sa	1,1 ± 0,02	6,8 ± 0,02
Del-3-glu	2,1 ± 0,01	12,9 ± 0,01
Ci-3-glu	0,9 ± 0,02	5,5 ± 0,02
AT	15,9 ± 0,01	100,0 ± 0,01

Valores promedios (n = 3) desviación estándar. Del-3-sa-5-glu: delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido; Del-3,5-diglu: delfinidina-3,5-diglucósido; Ci-3-sa-5-glu: cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido; Ci-3,5-diglu: cianidina-3,5-diglucósido; Del-3-sa: delfinidina-3-sambubiósido; Del-3-glu: delfinidina-3-glucósido; Ci-3-glu: cianidina-3-glucósido.

La del-3-sa-5-glu predominó (39,5% del total de antocianinas) en el JM (Tabla 1), similarmente a lo señalado por Escribano-Bailón *et al.* (2006), quienes indicaron que la antocianina más abundante fue la del-3-sa-5-glu (34% del total de las antocianinas). Por otra parte, Rojo *et al.* (2012) indicaron que la del-3-glu fue la antocianina más abundante en el fruto de maqui, mientras que Fredes *et al.* (2014<sup>b</sup>) indicaron que tanto la del-3,5-diglu como la del-3-glu, predominaron. Como se mencionó anteriormente, estas diferencias se deben principalmente a la variabilidad que existe entre las muestras de maqui analizadas en cada uno de los estudios.

Las antocianinas diglicosiladas se encontraron en mayor porcentaje (75%) respecto a aquellas que son monoglicosiladas (25%). Brauch *et al.* (2015) señalaron que en la naturaleza, las antocianinas glicosiladas tienen una estabilidad superior que su respectiva aglicona, así como también indican que existe una mayor estabilidad en antocianinas diglicosiladas sobre las antocianinas monoglicosiladas.

### 6.1.2. Encapsulación de antocianinas de JM por SA

En esta investigación las variables dependientes fueron la relación JM/AE y la temperatura del aire de entrada al secador, ya que han sido las principales variables de formulación y proceso en estudios sobre encapsulación de polifenoles (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2017). Para la evaluación del efecto significativo de las variables independientes sobre las variables dependientes se consideraron las formas lineales, cuadráticas y la interacción, considerando un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ . Se utilizó la MSR para la optimización del rendimiento y la EE de AT y antocianinas individuales.

La relación de JM/ MD:APS de los puntos axiales fue de 1:1,58 y 1:6,42, en la cual siempre se mantuvo una relación MD: APS de 2:1, la cual fue establecida de acuerdo a pruebas preliminares, considerando la viscosidad del APS y la solubilidad de la MD para la elaboración de micropartículas.

El diseño experimental del sistema de MJ/MD:APS (Anexo 8) indicó que la recuperación de las antocianinas fue entre 82,6 y 100,0%. Sin embargo, esta variable tuvo un 0% de ajuste al modelo, por lo tanto no fue considerada como variable en la optimización.

El rendimiento de los experimentos varió entre un 69,1 y 76,3%. La relación JM/ MD:APS tuvo un efecto lineal significativo ( $p \leq 0,05$ ) negativo sobre el rendimiento y no existió efecto significativo cuadrático (Anexo 9). El aumento del AE, generó una disminución del rendimiento, lo que podría explicarse por la viscosidad de la solución de alimentación, ya que a medida que se aumentaban los sólidos totales (aumentando la cantidad de AE y en consecuencia la de APS), la solución se tornaba más viscosa y por lo tanto tenía mayor dificultad para pasar a través del equipo de secado, permaneciendo adherida a la manguera de alimentación y formando una costra en la cámara de secado. Cai y Corke (2000) indicaron que soluciones de alimentación viscosas pueden causar que más sólidos se



adhieran a la pared de la cámara de secado, lo cual influiría en obtener menor cantidad de polvo luego del proceso.

La temperatura del aire de entrada al secador en su forma lineal y la interacción temperatura-JM/AE no tuvieron un efecto significativo sobre el rendimiento, sin embargo la temperatura en su forma cuadrática tuvo un efecto significativo positivo sobre el rendimiento ( $p \leq 0,05$ ), por lo tanto la temperatura del aire de entrada al secador se consideró en el modelo.

La EE de AT de los experimentos fluctuó entre un 74,7 y un 91,9%, teniendo la relación JM/AE en su forma lineal y cuadrática un efecto significativo sobre la EE ( $p \leq 0,05$ ) (Anexo 10). Dado que el efecto lineal de la relación JM/AE sobre la EE total de antocianinas fue positivo, a medida que aumentó la cantidad de AE, aumentó también la EE. La temperatura del aire de entrada al secador en su forma lineal, cuadrática y la interacción temperatura JM/AE no tuvieron un efecto significativo sobre la EE total de antocianinas.

La EE de las antocianinas individuales tuvo los siguientes rangos: 76,6 - 93,5% (del-3-sa-5-glu), 71,1 - 92,7% (del-3,5-diglu), 71,5 - 91,7% (ci-3-sa-5-glu + ci-3,5-diglu), 71,5 - 90,3% (del-3-sa), 66,5 - 89,3% (del-3-glu) y 65,3 a 88,8% (ci-3-glu). La relación JM/AE en su forma lineal y cuadrática tuvieron un efecto significativo ( $p \leq 0,05$ ) sobre la EE para todas las antocianinas analizadas, a diferencia de la temperatura del aire de entrada al secador que solo en su forma lineal tuvo un efecto significativo sobre la EE de la del-3-sa-5-glu y en su forma cuadrática para la EE de del-3-sa, en ambos casos, el efecto fue negativo. La EE de las antocianinas individuales tuvo diferencias significativas, que se explicarían por sus diferentes estructuras químicas, que generarían distintas interacciones antocianinas - AE.

El efecto lineal positivo de la relación JM/MD:APS sobre la EE de las antocianinas individuales mostró que al aumentar el contenido de MD:APS, aumentó la EE, debido a que

una mayor cantidad de AE favorece la interacción polímero-antocianinas, disminuyendo así la cantidad de antocianinas superficiales. Este resultado está de acuerdo con Robert *et al.* (2010) quienes indicaron que el AE influye significativamente en la EE de las antocianinas de granada.

La Figura 3 muestra el gráfico obtenido por MSR utilizando la función deseabilidad para la optimización del sistema de JM/MD:APS. La mayor deseabilidad fue de 0,92, en la cual se maximizaron las variables rendimiento, EE de AT y EE de antocianinas individuales, obteniéndose una temperatura del aire de entrada de 114°C, correspondiente al menor punto axial y una relación JM/AE de 1:4,14, cercana a los puntos centrales.

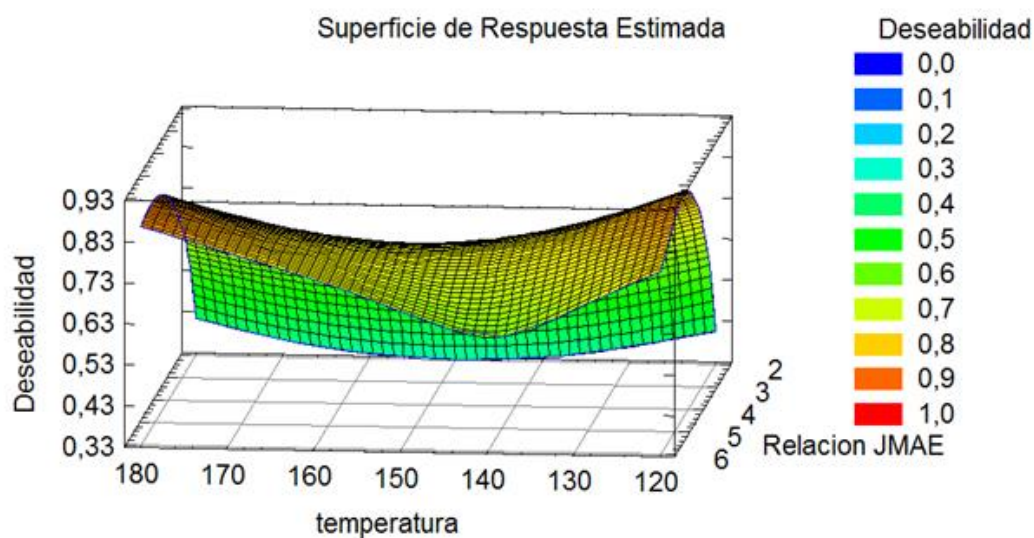


Figura 3. Gráfico de Superficie de respuesta para la optimización con diseño composito central para la microencapsulación de JM/MD:APS.

## 6.2. Comparación de las características físicas, químicas y morfológicas de las micropartículas obtenidas por SA y L.

Al obtener las condiciones experimentales óptimas para el SA, se replicaron las variables de formulación (cantidad de JM, APS y MD) para la microencapsulación por L y elaboración de micropartículas LA y LB.

Los perfiles de antocianinas obtenidos por HPLC de las micropartículas de JM por SA y L fueron similares al de JM (Figura 2B y 2C) y nuevamente la ci-3-sa se encontró bajo el límite de cuantificación. El contenido de AT por espectrofotometría de las micropartículas SA, LA y LB fue de 2,8; 2,6 y 2,6 mg ci-3-glu/g, respectivamente. Los resultados de cuantificación de AT en las micropartículas mediante pH diferencial y HPLC tuvieron una alta correlación ( $R^2=0,98$ ), donde los valores obtenidos por HPLC fueron entre un 20 y un 30% superiores a los de espectrofotometría. Otros autores (Fredes *et al.*, 2014<sup>b</sup>; Grace *et al.*, 2012; Lee y Finn, 2007) encontraron contenidos de AT mayores por HPLC que por el método de pH diferencial.

El contenido de AT en las micropartículas obtenidas por SA y L tuvieron diferencias significativas, sugiriendo que el método de encapsulación afectó el contenido de AT de las micropartículas, sin embargo, el tipo de molienda no tuvo un efecto en éste. El contenido de AT en este trabajo fueron mayores a los descritos para murtila (0,09 mg ci-3-glu/g) y arándano (1,14 mg ci-3-glu/g) (Ruiz *et al.*, 2010), micropartículas de andes berry (*Rubus glaucus*) con diversos AE (0,1 - 0,6 mg E ci-3-glu/g) (Villacrez *et al.*, 2014) y micropartículas de bayberry (*Myrica rubra Sieb.*) con MD (0,57mg Eci-3-glu/g) (Fang y Bhandari 2011). Robert *et al.* (2017) mencionó que polvos con un alto contenido de AT es demandado en la industria de alimentos.

La EE es un indicador importante de la microencapsulación, que se refiere al potencial del AE para retener el compuesto bioactivo dentro de la micropartícula (Mahdavi *et al.*, 2016<sup>b</sup>).

El método de encapsulación no afectó significativamente la EE de AT (Tabla 2), obteniéndose valores superiores al 92,5%, resultados similares describen Santana *et al.* (2016) para micropartículas de jussara obtenidas por SA utilizando una mezcla de goma arábica, almidón modificado y APS como AE, logrando EE entre 88,3 y 99,3%, por otra parte, los resultados fueron superiores a Robert *et al.* (2010), quienes al microencapsular jugo de granada por SA con APS o MD lograron EE de 58,5% y 86,6%, respectivamente. Por lo tanto, el uso de una mezcla de MD y APS mejoraría la EE de las antocianinas respecto al uso de estos AE en forma individual.

**Tabla 2. EE de AT y antocianinas individuales en micropartículas obtenidas por SA y L.**

	SA	LA	LB
EE AT (%)	92,5 ± 0,02 <sup>A</sup>	93,0 ± 0,01 <sup>A</sup>	93,9 ± 0,01 <sup>A</sup>
Del-3-sa-5-glu	93,7 ± 0,03 <sup>c,A</sup>	95,0 ± 0,04 <sup>c,B</sup>	96,1 ± 0,03 <sup>c,B</sup>
Del-3,5-diglu	92,4 ± 0,07 <sup>bc,A</sup>	93,9 ± 0,03 <sup>bc,AB</sup>	95,1 ± 0,05 <sup>bc,B</sup>
Ci-3-sa-5-glu + ci-3,5-diglu	92,8 ± 0,02 <sup>bc,A</sup>	94,1 ± 0,02 <sup>bc,B</sup>	95,4 ± 0,07 <sup>c,C</sup>
Del-3-sa	91,4 ± 0,06 <sup>b,A</sup>	92,8 ± 0,03 <sup>b,AB</sup>	93,8 ± 0,06 <sup>abc,B</sup>
Del-3-glu	88,9 ± 0,06 <sup>a,A</sup>	91,0 ± 0,07 <sup>a,B</sup>	92,6 ± 0,06 <sup>ab,B</sup>
Ci-3-glu	88,9 ± 0,08 <sup>a,A</sup>	90,3 ± 0,01 <sup>a,AB</sup>	92,2 ± 1,00 <sup>a,B</sup>

Valores promedios (n = 3) desviación estándar. <sup>a, b, c</sup> indican diferencias significativas (p≤0,05) para EE de cada antocianina, respecto al resto de las antocianinas, bajo un mismo método de microencapsulación. <sup>A, B, C</sup> diferencias significativas (p≤0,05) para EE de las antocianinas individuales respecto a SA: micropartículas de secado por atomización; LA micropartículas de liofilización con molienda con molinillo; LB: micropartículas de liofilización con molienda con mortero.

Las EE de las antocianinas individuales se analizaron respecto al método de microencapsulación y a su estructura (Tabla 2). Para los tres tipos de micropartículas, la EE de las antocianinas diglicosiladas fue significativamente superior respecto a las monoglicosiladas, por lo que se sugeriría que existe una mejor interacción entre la MD y el APS con las antocianinas diglicosiladas, que contienen un mayor número de grupo hidroxilos.

La recuperación de antocianinas por SA fue significativamente mayor (99,8%) que por L (92,0%) (Tabla 3). Estos valores de recuperación de antocianinas fueron superiores a los descritos para micropartículas provenientes de cascarilla de arroz mediante SA (47,7%) y L (71,9%) (Laokuldilok y Kanha, 2015). Adicionalmente, las micropartículas SA tuvieron una recuperación de antocianinas superior a lo descrito por Santana *et al.* (2016) para micropartículas de jussara (55,2 – 91,0%) con una mezcla de goma arábica/almidón modificado/APS. De acuerdo a los resultados obtenidos, las temperaturas usadas en ambos procesos de secado no tendrían un efecto mayor en la degradación de antocianinas.

**Tabla 3. Características físicas y químicas de micropartículas de JM/MD:APS obtenidas por SA y L.**

	SA	LA	LB
Recuperación (%)	99,8 ± 0,01 <sup>b</sup>	91,9 ± 0,01 <sup>a</sup>	91,8 ± 0,02 <sup>a</sup>
Rendimiento (%)	54,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	94,6 ± 0,01 <sup>b</sup>	94,6 ± 0,01 <sup>b</sup>
Humedad (%)	6,4 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,02 <sup>a</sup>
a <sub>w</sub>	0,3 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>a</sup>
Higroscopicidad (%)	39,4 ± 0,03 <sup>a</sup>	48,0 ± 0,02 <sup>b</sup>	53,1 ± 0,01 <sup>b</sup>
Densidad aparente (g/mL)	0,4 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>a</sup>

Valores promedios (n = 3) desviación estándar.<sup>a b</sup> indican diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre micropartículas. SA: micropartículas de secado por atomización; LA micropartículas de liofilización con molienda con molinillo; LB: micropartículas de liofilización con molienda con mortero.

El rendimiento (Tabla 3) fue significativamente mayor en las micropartículas elaboradas por L (95%) respecto a las SA (54,1%), Laokuldilok y Kanha (2015) indicaron diferencias en rendimiento del 20% en un polvo de antocianinas SA (>64%) y L (85%) usando otros AE. La mayor diferencia de rendimiento entre métodos de encapsulación en nuestro estudio, podría relacionarse con una mayor pérdida de solución de alimentación en el SA, debido a

la alta viscosidad del AE. Es importante destacar que a pesar que el costo del proceso L, el rendimiento del método de liofilización es superior al SA (Amrani y Brigui, 2007).

Las micropartículas obtenidas por SA tuvieron un contenido de humedad (6,4%) significativamente mayor que las L (3,2%) (Tabla 2). Fang y Bhandari (2011) y Silva *et al.* (2013) describen contenidos de humedad más bajos (4,04 y 4,8% respectivamente) para polvos de antocianinas obtenidos por SA utilizando MD. Sin embargo Robert *et al.* (2015) indican un contenido de humedad del 5,5% para un polvo de jugo de tuna púrpura utilizando una mezcla de MD y APS. Por lo tanto, el uso de APS produciría micropartículas con un mayor contenido de humedad. El contenido de humedad es una propiedad muy importante en polvos, ya que es un indicador de la eficiencia del proceso de secado y junto con la temperatura, afectan la vida útil de un producto en polvo (Santana *et al.*, 2016). En general, alimentos secos con contenidos de humedad entre 3 y 10%, muestran una buena estabilidad de almacenamiento (Klaypradit y Huang, 2008).

Los resultados de  $a_w$  para micropartículas SA (0,3) y L (0,1) fueron similares a los descritos por Laokuldilok y Kanha (2015), donde polvos SA tuvieron mayor  $a_w$  que L. Adicionalmente, los mismos autores (Laokuldilok y Kanha, 2015), citando a Ray y Bhunia (2013) señalan que un polvo con  $a_w$  menor a 0,6 no favorecería el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Por otra parte, una baja  $a_w$  se asocia a una baja probabilidad de reacciones de deterioro (FAO, 2004).

La higroscopicidad (Tabla 3) fue significativamente mayor para las micropartículas obtenidas por L (48,0% LA y 53,1% LB) respecto a las SA (39,4%). Cai y Corke (2000) indican que los polvos de SA tienen una menor higroscopicidad que los polvos L y que por lo tanto, éstos absorben la humedad del medioambiente con mayor facilidad. Adicionalmente, no se encontró una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de higroscopicidad para los dos tipos de molienda, por lo tanto el tamaño de partícula obtenido

(por LA y LB) no afectaría la cantidad de agua que pueda captar las micropartículas del medioambiente. Los resultados de higroscopicidad y contenido de humedad de las micropartículas de este estudio fueron congruentes con lo descrito por Tonon *et al.* (2010) y Mahdavi *et al.* (2016<sup>a</sup>), quienes indican que los polvos con un contenido de humedad más bajo tienen una mayor capacidad para captar la humedad ambiental, que estaría relacionado con una mayor gradiente de concentración de agua entre el producto y el aire circundante.

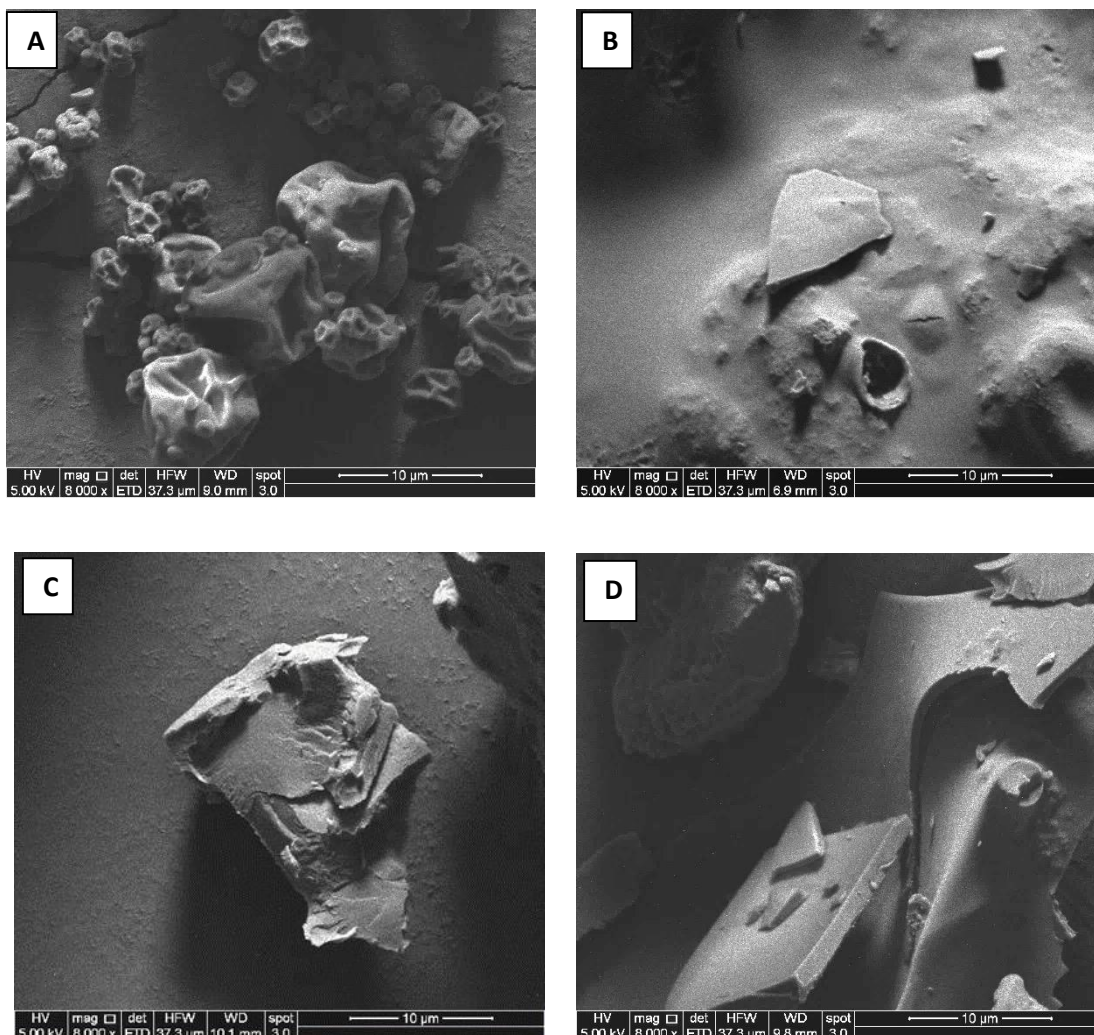
La densidad aparente de las micropartículas relaciona el peso seco de éstas y el volumen que ocupan, considerando todo el espacio que existe entre micropartículas (Tonon *et al.*, 2010). La densidad aparente (Tabla 3) de las micropartículas L (0,3 g/mL) fue significativamente menor que las SA (0,4 g/mL). No se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para las micropartículas LA y LB. Resultados similares describieron Laokuldilok y Kanha (2015) para micropartículas SA y L (0,33 g/mL y 0,34 g/mL, respectivamente) y Tonon *et al.* (2010), para micropartículas elaboradas con MD (0,38 g/mL). Estos resultados fueron concordantes con Ferrari *et al.* (2012) quienes indican que los polvos con más humedad generan un material más pesado que se acomoda más fácilmente en los espacios entre partículas y ocupa menos espacio, resultando en una mayor densidad aparente. Adicionalmente Cai y Corke (2000) sugieren que a menor densidad aparente, existe una mayor posibilidad de degradación oxidativa de los pigmentos y menor estabilidad de almacenamiento. De acuerdo a lo anterior, las micropartículas obtenidas por L, sin importar el proceso de molienda, podrían ser menos estables que las micropartículas SA.

De acuerdo con Malvern (2017), el tamaño de las partículas es una medición que toma como supuesto que las micropartículas analizadas son esféricas. El diámetro promedio de las SA fue de 5,57  $\mu\text{m}$ , donde bajo el 90% del volumen total de las muestras analizadas fue menor a 10,95  $\mu\text{m}$  (Anexo 11). Esto fue consistente con lo descrito por Gong *et al.* (2007)

quienes señalaron que frecuentemente las micropartículas obtenidas por SA tienen tamaños menores a 50  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas obtenidas por LA, alcanzaron un diámetro promedio de 44,57  $\mu\text{m}$ , donde un 90% del total de las muestras tuvo un diámetro menor a 93,99  $\mu\text{m}$  (Anexo 12). Las micropartículas LB tuvieron tamaños mayores, donde el diámetro promedio fue de 53,86  $\mu\text{m}$ , y el 90% de las muestras tuvo un diámetro menor a 117,07  $\mu\text{m}$  (Anexo 13). Por lo tanto, el método de encapsulación y de molienda afecta directamente el tamaño de las micropartículas. Resultados similares fueron descritos por Goula y Adamopoulos (2010) quienes señalan que a mayor tamaño de partícula, menor densidad aparente, lo que podría resultar en una menor estabilidad de las micropartículas.

Fang y Bhandari (2010) señalaron que la morfología de las micropartículas se ve afectada por el método de encapsulación, donde las micropartículas de SA son esféricas, mientras que las micropartículas L tienen formas inciertas. Estas observaciones fueron consistentes con las fotografías SEM obtenidas en este estudio (Figura 4).





**Figura 4: Morfología de micropartículas (SEM) a 5KV:** Fotografías de micropartículas de A: SA (micropartículas de secado por atomización), B: Liofilización Bloque, C: LA (micropartículas de liofilización con molienda con molinillo) y D: LB (micropartículas de liofilización con molienda con mortero).

Las micropartículas SA (Figura 4A) presentaron formas esféricas y con abolladuras, de tamaños irregulares, con superficies lisas, con tendencia a la aglomeración. Micropartículas con morfologías similares se encontraron en fotografías obtenidas por Ferrari *et al.* (2012), Tonon *et al.* (2010), Laokuldilok y Kanha (2015) y Robert *et al.* (2010), quienes indicaron que el encogimiento de las micropartículas se atribuye al proceso de secado. La morfología de las micropartículas dependería del AE utilizado, independientemente del tipo de compuesto activo encapsulado (Robert *et al.*, 2010). Las micropartículas con formas

esféricas lisas favorecerían la estabilidad de los compuestos encapsulados y también controlarían su liberación (Osorio *et al.* 2010; Laokuldilok y Kanha; Cai y Corke 2000).

La Figura 4B muestra la fotografía del producto seco después de la L, que corresponde a un bloque con algunas grietas y hendiduras. Las fotografías de las micropartículas LA (Figura 4C) y LB (Figura 4D) muestran formas no definidas con presencia de grietas, siendo más notorias en las LA. Las diferencias en la morfología de ambas se debe al tipo de molienda; el molinillo generó micropartículas superficies irregulares, mientras que el mortero originó micropartículas con superficies más lisas. Laokuldilok y Kanha (2015), obtuvieron fotografías que denotan morfologías similares para las micropartículas de L, indicando que se produjeron muchas grietas en la superficie de las partículas de la mayoría de los polvos liofilizados, lo que podría afectar la estabilidad de las antocianinas durante el almacenamiento debido a la permeabilidad al oxígeno.

### 6.3. Propiedades de reconstitución de micropartículas de JM.

En el desarrollo de formulaciones alimenticias en polvo es muy importante la facilidad de reconstituirlos en agua (Ceballos *et al.*, 2012). Las propiedades de reconstitución de las micropartículas obtenidas por SA y L se indican en la Tabla 4.

**Tabla 4. Reconstitución de micropartículas obtenidas por SA y L.**

	SA	LA	LB
Solubilidad (%)	70,4 ± 0,01 <sup>b</sup>	59,9 ± 0,02 <sup>a</sup>	59,1 ± 0,02 <sup>a</sup>
Dispersabilidad (%)	99,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	100 ± 0,01 <sup>a</sup>	97,7 ± 0,01 <sup>a</sup>
pH	5,3 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,02 <sup>a</sup>
AT pH diferencial (mg ci-3-glu/g)	2,8 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,21 <sup>a</sup>
AT HPLC (mg E ci-3-glu/g)	3,6 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,40 <sup>a</sup>

Valores promedios (n = 3) desviación estándar. <sup>a,b</sup> indican diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre micropartículas. SA: micropartículas de secado por atomización; LA micropartículas de liofilización con molienda con molinillo; LB: micropartículas de liofilización con molienda con mortero.

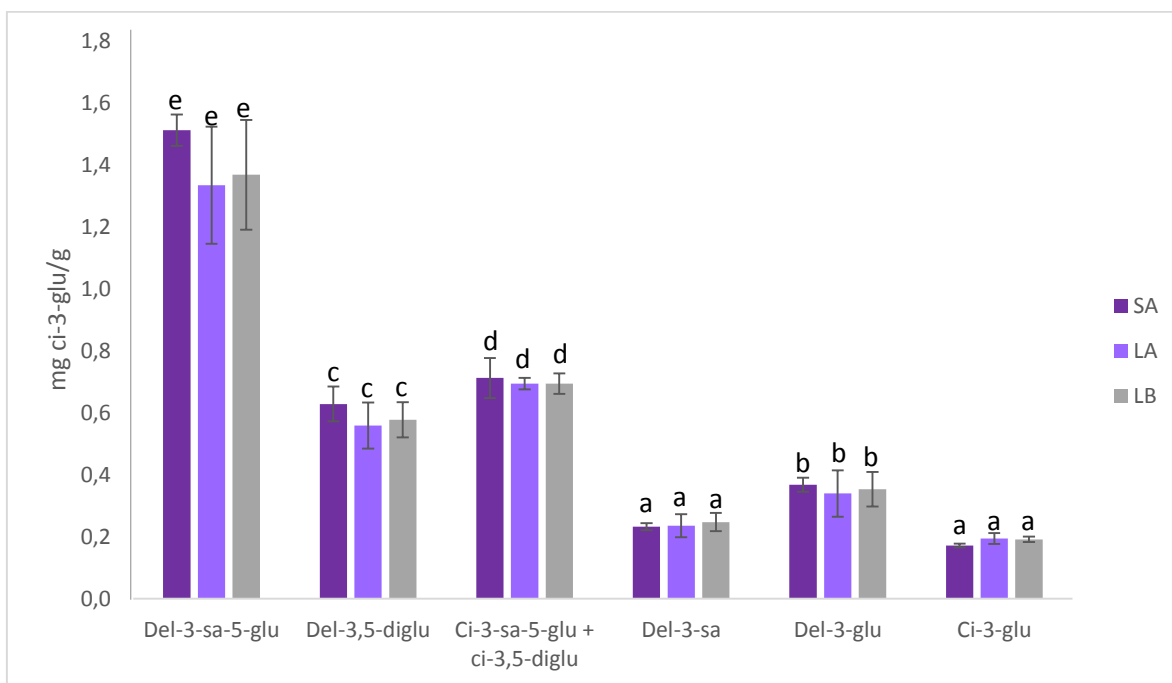
La solubilidad de las micropartículas obtenidas por SA (70,4%) fue significativamente superior a las obtenidas por L (59,9% LA y 59,1% LB), no encontrándose diferencias significativas entre estas últimas. La mayor solubilidad de las micropartículas SA se podría relacionar con sus menores tamaños de partículas y la mayor superficie de contacto con el agua.

Los valores de solubilidad fueron inferiores a los descritos por Laokuldilok y Kanha (2015), quienes indicaron que las micropartículas SA tuvieron una solubilidad en un rango entre 76,2 y 91,8%, mientras que para L entre 82,1 y 84,2%, utilizando MD como AE. Adicionalmente, Tonon *et al.* (2009) indican una solubilidad de 95,3% para micropartículas SA de acaí con MD. La mayor solubilidad de las micropartículas descritas en la literatura podría deberse a la alta solubilidad de la MD en agua ( $\leq 98\%$  a 25 °C). Por otra parte, Santana *et al.* (2016) indicaron que al incluir APS a una mezcla de polisacáridos (goma arábica, almidón modificado) disminuye la solubilidad de micropartículas de jussara por SA de 92,8 a 81,3%. Adicionalmente, la menor solubilidad de las micropartículas obtenidas en este estudio podría deberse al alto contenido de azúcares totales de JM (Cano-Chauca *et al.* 2005).

La dispersabilidad es la habilidad de un polvo para separarse en diferentes partículas cuando es agregado en agua con agitación, en consecuencia una mayor dispersabilidad indicaría una menor formación de grumos (Laokuldilok y Kanha, 2015). La dispersabilidad de las micropartículas no tuvo diferencias significativas entre los métodos de encapsulación y los resultados obtenidos fueron superiores a los descritos por Laokuldilok y Kanha (2015) donde la dispersabilidad de SA y L se encontraron en rango entre 73,0 y 94,4%. La utilización de APS favorecería por lo tanto, la dispersabilidad de las micropartículas.

Al reconstituir las micropartículas SA, LA y LB en agua (25 °C) se mantuvo el perfil de antocianinas descrito para el JM. No se encontraron diferencias significativas en el

contenido de AT y antocianinas individuales entre los métodos de encapsulación (Figura 5), predominando las antocianinas diglicosiladas (77,6%) por sobre las monoglicosiladas (22,4%).

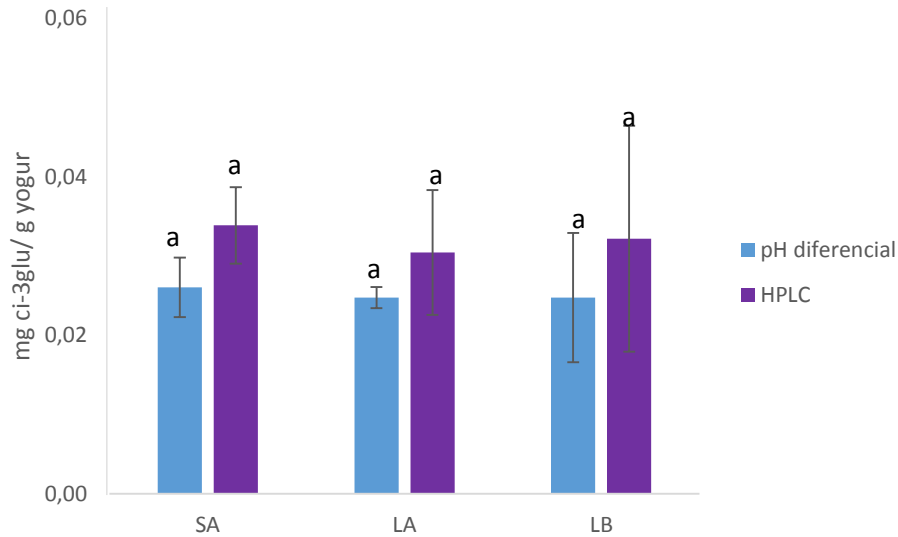


**Figura 5: Contenido de antocianinas individuales en las micropartículas SA, LA y LB reconstituidas.**

*a,b,c,d,e* indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). SA: micropartículas de secado por atomización; LA micropartículas de liofilización con molienda con molinillo; LB: micropartículas de liofilización con molienda con mortero.

#### **6.4. Análisis de la influencia de una matriz alimenticia sobre la estabilidad de las antocianinas de JM microencapsuladas por SA y L.**

La estabilidad de las antocianinas de micropartículas de JM se estudió en un yogur natural durante 35 d. Los contenidos iniciales de AT en yogur (Figura 6) fueron similares a los obtenidos para la reconstitución de las micropartículas en agua (Tabla 4); lo que sugeriría que no existen interacciones entre las antocianinas y los componentes del yogur que afecten su retención.



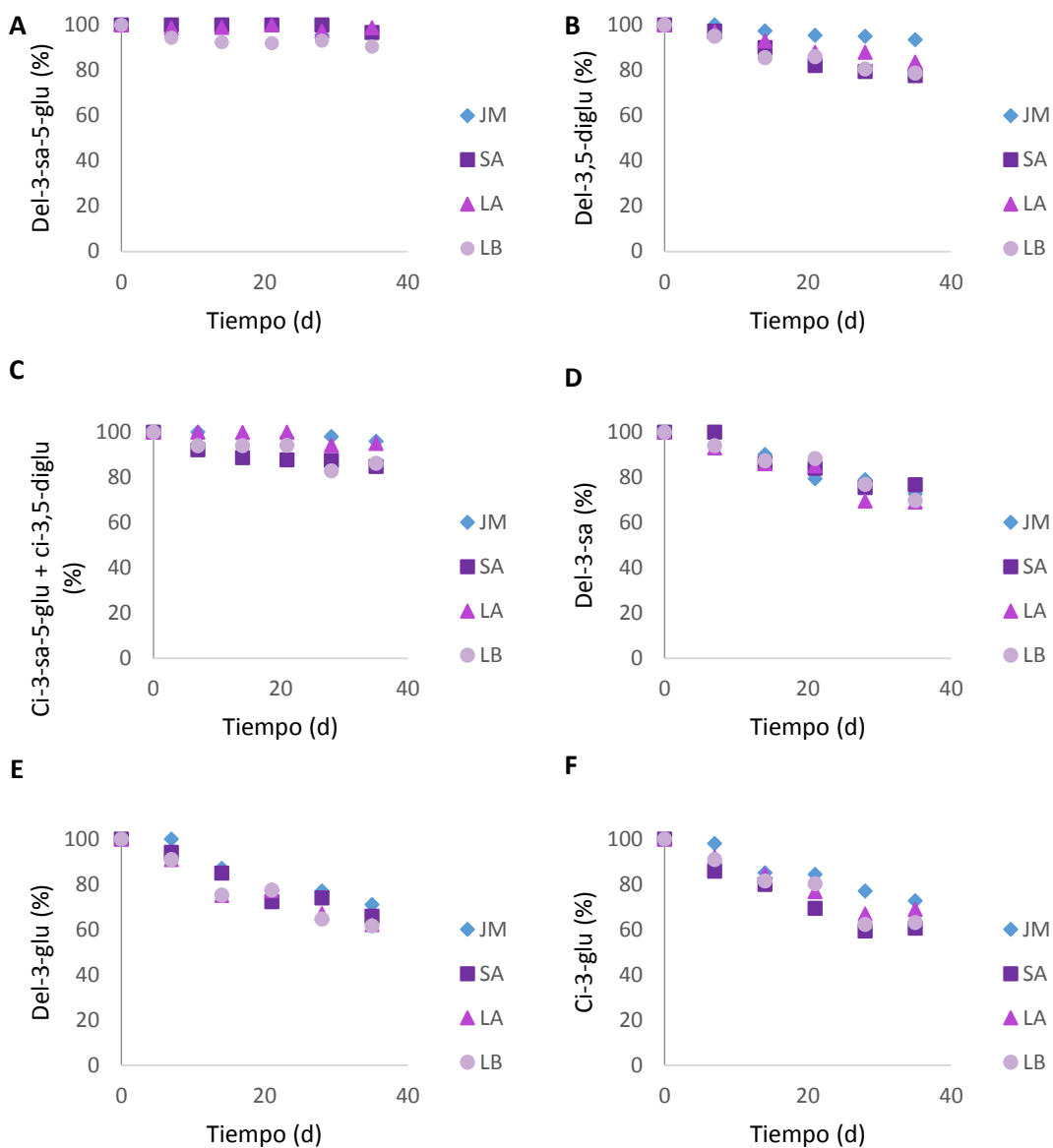
**Figura 6: Contenido inicial de antocianinas en yogur con micropartículas de JM.**

Columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). SA: micropartículas de secado por atomización; LA micropartículas de liofilización con molienda con molinillo; LB: micropartículas de liofilización con molienda con mortero.

La evolución de la retención de las AT fue similar entre los diferentes métodos de encapsulación y el control. Asimismo, Robert *et al.* (2010) mostraron que la retención de las antocianinas de jugo de granada encapsuladas y sin encapsular adicionadas a un yogur siguieron un comportamiento similar. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio mostraron una mayor retención de AT (SA, 82%; LA, 88% y LB, 81%) a los 35 d en comparación con Coisson *et al.* (2005) y Robert *et al.* (2010) quienes indican que antocianinas de acaí y de jugo de granada (microencapsuladas con MD y APS) en yogur fueron estables sólo por 2 y 7 d a 4°C, respectivamente.

Los estudios anteriores de estabilidad de antocianinas en yogur, sólo se enfocaron en la cuantificación de AT (Coisson *et al.*, 2005; Wallace y Giusti, 2008; Robert *et al.*, 2010; Karaaslan *et al.*, 2011). En este estudio, de manera similar a las AT, la evolución de la retención de las antocianinas individuales fue similar entre los métodos de encapsulación y el control (Figura 7). A los 35 d de almacenamiento a 4 °C, la del-3-sa-5-glu mostró la mayor

retención en un rango de 90 - 99%, mientras que la ci-3-glu mostró la menor retención en un rango de 61 – 69% para los diferentes tipos de micropartículas.



**Figura 7: Evolución de la retención (%) de antocianinas individuales en muestras de yogur con JM y micropartículas de JM almacenadas durante 35 d a 5°C. A: del-3-sa-5-glu, B: del-3,5-diglu, C: ci-3-sa-5-glu + ci-3,5-diglu, D: del-3-sa, E: del-3-glu, F: ci-3-glu.**

Fang (2014) indica que las antocianinas en soluciones acuosas sufren reordenamientos estructurales en respuesta a cambios de pH, generando cuatro estructuras moleculares: catión flavilo, base quinoidal, carbinol y chalconas. Las antocianinas son más estables en soluciones de pH 1–3 donde existen principalmente como cationes flavilos (coloreados). A pH sobre 4, las antocianinas adoptan estructuras de carbinol (incolora) y chalcona (amarillentas). Las chalconas pueden sufrir degradaciones químicas produciendo ácidos fenólicos. En este estudio, la incorporación de JM y las micropartículas de JM no modificaron el pH del yogur (4,3) y éste se mantuvo estable durante el almacenamiento. Por lo tanto, la degradación de las antocianinas se debería principalmente al pH de la matriz que favorecería la formación de chalconas y ácidos fenólicos.

De acuerdo con (Giusti y Wrolstad, 1996; Wallace y Giusti, 2008), la degradación de las antocianinas sigue cinéticas de degradación de primer orden. En este estudio, las constantes de degradación ( $k$ ) se calcularon solamente para las antocianinas monoglicosiladas, ya que éstas alcanzaron una retención inferior al 70% a los 35 d.

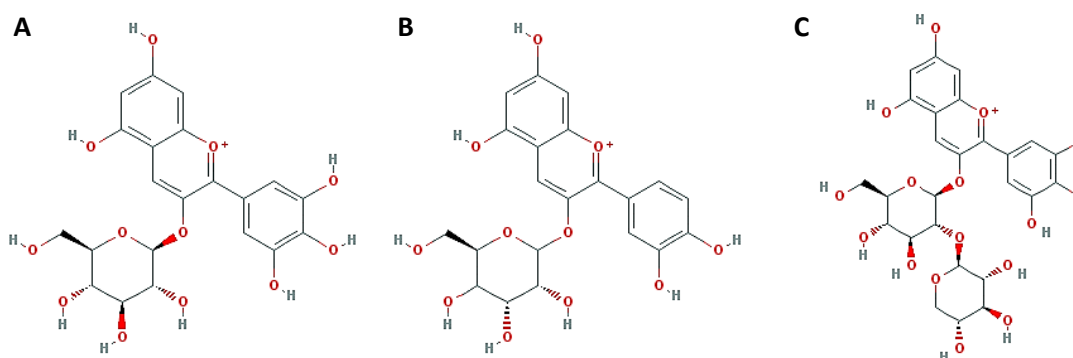
El método de encapsulación no afectó significativamente la estabilidad de las antocianinas monoglicosiladas como se ve reflejado en los resultados de vida media (Tabla 5). Esto sugeriría que las diferencias en el tamaño de partículas y la morfología de las micropartículas SA y L obtenidas en este estudio no afectarían la estabilidad de las antocianinas como han propuesto diferentes autores (Fang y Bhandari, 2010; Laokuldilok y Kanha, 2015).

**Tabla 5. Valores de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las antocianinas en yogur con micropartículas de JM durante el almacenamiento a 4 °C.**

	$t_{1/2}$ (d)			
	Control (JM)	SA	LA	LB
Del-3-sa	75 ± 8 <sup>b,A</sup>	75 ± 11 <sup>b,A</sup>	67 ± 11 <sup>b,A</sup>	70 ± 4 <sup>b,A</sup>
Del-3-glu	65 ± 9 <sup>a,B</sup>	59 ± 5 <sup>ab,AB</sup>	48 ± 8 <sup>a,A</sup>	46 ± 4 <sup>a,A</sup>
Ci-3-glu	68 ± 7 <sup>a,C</sup>	44 ± 2 <sup>a,A</sup>	59 ± 9 <sup>a,BC</sup>	50 ± 7 <sup>a,B</sup>

Valores promedios (n = 3) desviación estándar. <sup>a,b</sup> indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre yogures con micropartículas de JM. <sup>A,B</sup> indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre antocianinas. JM: yogur con jugo de maqui SA: yogur con micropartículas de secado por atomización; LA yogur con micropartículas de liofilización con molienda con molinillo; LB: yogur con micropartículas de liofilización con molienda con mortero.

La estructura química de las antocianinas monoglicosiladas (Figura 8) tuvo un efecto significativo en la vida media, siendo la del-3-sa (Figura 8C) significativamente superior a las del-3-glu (Figura 8A) y ci-3-glu (Figura 8B). Por lo tanto se sugeriría que existe un efecto de la xilosa como azúcar que compone la del-3-sa que favorecería su estabilidad en yogur. Brauch *et al.* (2015) indicaron que antocianinas monoglicosiladas de JM almacenadas por 84 d a 4°C alcanzaron una mayor vida media (88 - 89 d) en comparación con nuestros resultados. Estas diferencias de vida media podrían deberse principalmente al uso de yogur como matriz alimenticia, donde el pH favorecería la degradación de las antocianinas.



**Figura 8: Estructura química de antocianinas monoglicosiladas de JM. A: del-3-glu B: ci-3-glu C:del-3-sa. Fuente: PubChem (2017).**



La incorporación de micropartículas de JM obtenidas por SA y L mostraron resultados similares al yogur con JM, por lo tanto la utilización de micropartículas podría favorecer la utilización de JM como un ingrediente en polvo, de fácil almacenamiento y gran estabilidad, sin afectar las antocianinas significativamente cuando se incorporan en una matriz como yogur.

#### **6.5. Estudio la estabilidad de las micropartículas en un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*.**

El estudio de la BA de compuestos bioactivos se realiza generalmente en condiciones *in vitro* principalmente porque los ensayos en humanos suelen tener precios elevados y son éticamente cuestionables. Adicionalmente, las simulaciones *in vitro* son una alternativa rápida y entregan resultados que proveen información para la ejecución de sucesivos estudios en modelos animales y humanos (Lin *et al.* 2008; Coni *et al.* 2000).

Recientemente, Lucas-González *et al.* (2016) demostraron que la estabilidad de las antocianinas de un fruto liofilizado de maqui fue significativamente afectada en la fase intestinal durante la digestión gastrointestinal *in vitro*. En este contexto, se estudió la estabilidad de las antocianinas de micropartículas de JM en comparación con un JM sin encapsular en un modelo de digestión *in vitro* con la finalidad de evaluar la protección del AE en el TGI. El modelo de digestión *in vitro* utilizado simula el proceso de digestión en boca, estómago e intestino delgado (duodeno).

Para evaluar la inhibición de la degradación de las antocianinas se determinó su BA, definida como la cantidad de compuesto (antocianinas) que se libera de la matriz, después de la digestión, reflejando su potencial de biodisponibilidad (Lila *et al.* 2012). En este estudio la matriz fue la micropartícula JM-(MD:APS) y el control el JM.

La BA de las AT fue significativamente superior para las micropartículas de JM (SA: 45,8%; L: 44,6%) respecto al JM (38,3%). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de micropartículas (SA y L) lo que sugeriría que el tamaño y morfología de éstas no produciría un efecto sobre la BA.

De acuerdo a la literatura existente (Lila *et al.* 2012; Flores *et al.* 2014; Mosele *et al.* 2015; Lucas-González *et al.* 2016), en general las antocianinas son conocidas por su inestabilidad a pH alto, y el cambio de pH ácido (pH 2) del estómago a un pH casi neutro (pH 6) en el intestino podría ser el responsable de su hidrólisis y/o degradación. A pesar de que el pH de la boca es neutro (pH 7), Mosele *et al.* (2016) indicaron para un modelo de simulación GI *in vitro* que existen modificaciones mínimas de las antocianinas en la boca debido a un tiempo corto de exposición, resultando en un efecto marginal de la  $\alpha$ -amilasa.

Cuando las antocianinas se encapsulan con proteínas y/o polisacáridos, existe una liberación competitiva de ellas desde las micropartículas en el estómago donde se mantienen estables (Oidtmann *et al.* 2012). Flores *et al.* (2014) señalan que las condiciones enzimáticas y de pH en el estómago son altamente extractivas, lo que afectaría la integridad de las micropartículas, favoreciendo la liberación de las antocianinas. En el intestino delgado (duodeno), las antocianinas se liberan igualmente desde las micropartículas (30 min) pero en esta fase sí existe degradación después de la liberación (Oidtmann *et al.* 2012). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la mayor BA de las antocianinas encapsuladas respecto al JM se debería a un menor tiempo de exposición de éstas a las condiciones del intestino.

La BA de las antocianinas individuales de las micropartículas fue significativamente superior a las del JM sin encapsular (del-3-sa-5-glu: 35,0%, del-3,5-diglu: 36,4%, ci-3-sa-5-glu + ci-3,5-diglu: 48,9%, del-3-sa: 21,8%, del-3-glu: 21,2%, ci-3-glu: 24,0%). Adicionalmente, la BA

entre antocianinas individuales tuvo diferencias significativas, donde la mayor BA fue para las ci-3-sa-5-glu + ci-3,5 diglu y la menor bioaccesibilidad fue para la del-3-glu (Tabla 6).

**Tabla 6. Bioaccesibilidad de antocianinas de micropartículas de JM-(MD:APS), usando un modelo de digestión *in vitro*.**

	SA		L	
	mg/g en micropartícula	Bioaccesibilidad %	mg/g en micropartícula	Bioaccesibilidad %
Del-3-sa-5-glu	1,34 ± 0,2	43,2 ± 0,4 <sup>c, A</sup>	1,38 ± 0,8	40,7 ± 1,2 <sup>b, A</sup>
Del-3,5-diglu	0,63 ± 0,5	34,5 ± 0,7 <sup>bc, A</sup>	0,62 ± 0,4	36,1 ± 1,1 <sup>b, A</sup>
Ci-3-sa-5-glu + ci-3,5 diglu	0,66 ± 0,7	78,5 ± 4,7 <sup>d, A</sup>	0,64 ± 0,6	76,5 ± 1,4 <sup>d, A</sup>
Del-3-sa	0,27 ± 0,1	24,8 ± 0,2 <sup>ab, A</sup>	0,27 ± 0,4	28,5 ± 1,5 <sup>a, A</sup>
Del-3-glu	0,43 ± 0,2	20,8 ± 0,2 <sup>a, A</sup>	0,44 ± 0,1	22,6 ± 0,3 <sup>a, A</sup>
Ci-3-glu	0,22 ± 0,4	43,8 ± 1,7 <sup>c, A</sup>	0,21 ± 0,7	49,6 ± 2,2 <sup>c, A</sup>

Valores promedios (n = 3) desviación estándar. Columnas con letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre micropartículas. <sup>a,b,c,d</sup> indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre antocianinas. SA: micropartículas de secado por atomización; L: micropartículas de liofilización.

De acuerdo con Kraus *et al.* (2010) y Lila *et al.* (2012), las antocianinas difieren en su estabilidad en el medio del intestino delgado. Nuestros resultados son comparables con lo descrito por Lila *et al.* (2012) quienes observaron un comportamiento de BA similar para antocianinas de maqui sin encapsular. Estos autores sugieren que la mayor BA de la ci-3-sa-5-glu más la ci-3,5-diglu sería posible debido a que la combinación de las dos cianidinas con dos azúcares enlazadas generaría una estructura de antocianina más estable.

Por último, los resultados de BA de las antocianinas de las micropartículas del JM y del JM fueron superiores a lo descrito por Lila *et al.* (2012) para un extracto semi-purificado de antocianinas de maqui (~4%). Las diferencias entre el JM y el extracto semi-purificado podrían explicarse por el efecto protector adicional que entregaría el JM como matriz. En este contexto, McDougall *et al.* (2005) sugieren que los polifenoles generarían uniones con

la matriz alimenticia durante la digestión, que podrían proteger de esta manera a las antocianinas más lábiles de la degradación.

## Conclusiones

La optimización del rendimiento, la EE de AT y antocianinas individuales usando una MSR permitió establecer que las condiciones experimentales óptimas para la elaboración de micropartículas de JM usando MD y APS por SA fueron una temperatura del aire de entrada al secador de 114°C, que corresponde a una temperatura baja para los estudios de SA y una relación JM/AE de 1:4,14, que refleja la necesidad de un mayor contenido AE dado el contenido alto de antocianinas en el JM.

Los perfiles de antocianinas de las micropartículas obtenidas por SA y L fueron similares a los del JM, donde predominaron antocianinas diglicosiladas (~70%). Se aprueba la hipótesis del rendimiento de los métodos de encapsulación, donde el rendimiento de las micropartículas L (LA y LB) fue aproximadamente el doble que el de las micropartículas obtenidas por SA. Adicionalmente, las principales diferencias encontradas entre las micropartículas SA, LA y LB se relacionan con su tamaño y morfología. De esta manera, la solubilidad de las micropartículas SA fue superior en un ~10% respecto a las L, mientras que la dispersabilidad indicó que los tipos de micropartículas tienen una baja tendencia a la aglomeración cuando las micropartículas son reconstituidas en agua.

Se rechaza la hipótesis que supone que el método de encapsulación afecta la EE de las antocianinas. Sin embargo, la estructura química de las antocianinas afecta la EE de antocianinas individuales, donde la EE de antocianinas diglicosiladas fue significativamente superior respecto a las monoglicosiladas.

La vida media de la del-3-glu y ci-3-glu compuestos limitantes en el estudio de las antocianinas de las micropartículas de JM en yogur fue superior (46 y 44 d, respectivamente), a la vida útil del producto (35 d), donde la incorporación de

micropartículas de JM favorecería la utilización de antocianinas de JM como un ingrediente en polvo funcional.

La degradación de las antocianinas en el TGI estaría influenciada por el tiempo de exposición y el pH del medio, y las diferencias morfológicas y de tamaño de las micropartículas de JM estudiadas no afectarían la estabilidad. El JM como matriz ofrecería una protección de las antocianinas adicional al AE, favoreciendo la producción de micropartículas de JM en un proceso más sustentable. Los resultados obtenidos entregarían antecedentes del comportamiento de las antocianinas de JM en el TGI para estudios futuros en modelos animales y humanos.

Finalmente, la microencapsulación de antocianinas de JM usando MD y APS sería una alternativa de desarrollo de un ingrediente funcional en polvo, con un alto contenido de antocianinas, con buenas propiedades de reconstitución, estable en matrices acuosas como el yogur, mejorando en un 7% la BA de las antocianinas del JM.

## Referencias bibliográficas

Amrani M., Brigui J. (2007). "Impact du procédé de lyophilisation sur la qualité des fraises".  
Revista Ingeniería e investigación, 27:51-55.

AOAC. (1996). "Official methods of analysis of AOAC International." 16th ed. Gaythersburg,  
USA.

Aravena G., García O., Muñoz O., Pérez-Correa J., Parada J. (2016) "The impact of cooking  
and delivery modes of thymol and carvacrol on retention and bioaccessibility in starchy  
foods". Food Chemistry, 196:848–852.

Baracat M., Nakagawa A., Casagrande R., Georgetti S., Verri W.y de Freitas O. (2012)  
"Preparation and Characterization of Microcapsules Based on Biodegradable Polymers:  
Pectin/Casein Complex for Controlled Drug Release Systems". American Association of  
Pharmaceutical Scientists, 13: 364-372.

Benedetti S. (2012) "Información Tecnológica de productos forestales no madereros del  
bosque nativo en Chile: Monografía de Maqui *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz". Proyecto  
CONAF-INFOR. Plataforma de sistematización y difusión de información tecnológica de  
productos forestales no madereros PFNM del bosque nativo. Pág. 7.

Benzie, I. F. y J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure  
of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239(1): 70-76.

Boyland, E., y Walker, S. A. (1974). "Effects of thiocyanate on nitrosation of amines". Nature,  
248: 601–602.

Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier y C. Berset (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT-Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.

Brauch, J., M. Buchweitz, R. Schweiggert y R. Carle (2016). "Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice." *Food Chemistry*, 190: 308-316.

Brauch, J. E., M. Kroner, R. M. Schweiggert y R. Carle (2015). "Studies into the Stability of 3-O-Glycosylated and 3, 5-O-Diglycosylated Anthocyanins in Differently Purified Liquid and Dried Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) Preparations during Storage and Thermal Treatment". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(39): 8705-8714.

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

Cal K., Sollohub K. (2010). "Review: Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99: 575-586.

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(4): 420–428.

Carbonell-Capella J., Buniowska M., Barba F., Esteve M., Frígola A. (2014) "Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 155-171.



Ceballos A., Giraldo G., Orrego C. (2012). "Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp". *Journal of Food Engineering*, 111:360–365.

Céspedes C., Valdez-Morales M., Ávila J., El-Hafidi M., Alarcón J., Paredes-López O. (2010). "Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (*Elaeocarpaceae*)". *Food Chemistry*, 119:886–895.

Civello P., Martínez G., Chaves A. (1997) "Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:4589–4594.

Coisson J., Travaglia F., Piana G., Capasso M., Arlorio M. (2005) "Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt". *Food Research International* 38: 893-897.

Coni E., Di Benedetto R., Di Pasquale M., Masella R., Modesti D., Attei R. (2000). "Protective effect of oleuropein, and olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits". *Lipids*, 35: 45-54.

Desai K., Park H. (2005). "Recent developments in microencapsulation of food ingredients". *Drying Technology*, 23:1361-1394.

Earle R. (1968) "Ingeniería de los alimentos". Inglaterra. Editorial Acribia. Capítulo 8: Reducción de tamaños. Pp 277-286.

Eiro, M., M. Heinonen (2002). "Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(25): 7461-7466.

Escribano-Bailón M. Alcalde-Eon C., Muñoz O., Rivas-Gonzalo J. Santos-Buelga C. (2006). "Anthocyanins in Berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz)". *Phytochemical Analysis*, 17:8-14.

Fang J. (2014). "Review article: Bioavailability of anthocyanins". *Drug Metabolism Reviews*, 46(4): 508–520.

Fang, J.; Bhandari, B. (2011). "Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols". *Food Chemistry*, 129: 1139–1147.

FAO (1992). "Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Chapter 6: Isolated Soybean Protein (ISP)" Búsqueda en línea: <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e07.htm>. Agosto de 2015.

FAO (2004). "Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas: Manual de capacitación". Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Pág.3.

Ferrari, C., Marconi, S., Dutra, I., Zaratini, F., De Aguirre, J. (2012). "Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying". *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 1237–1245.

Flores F., Singh R., Kerr W., Pegg R. y Kong F. (2014). "Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during *in vitro* digestion". Food Chemistry, 153:272–278.

Fredes, C., G. Montenegro, J. P. Zoffoli, M. Gómez y P. Robert (2012). "Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* Molina Stuntz) during fruit development and maturation in Central Chile". Chilean Journal of Agricultural Research 72(4): 582-589.

Fredes C., Montenegro G., Zoffoli J., Santander F., Robert P. (2014<sup>a</sup>). "Comparison of the total phenolic content, total anthocyanin content and antioxidant activity of polyphenol-rich fruits grown in Chile". Ciencia e Investigación Agraria, 41: 49-60.

Fredes C., Robert P. (2014). "The powerful color of the maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) fruit". Journal of Berry Research, 4: 175 - 182.

Fredes C., Yousef G., Robert P., Grace M., Lila M., Gómez M., Gebauer M., Montenegro G. (2014<sup>b</sup>). "Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile". Journal of the Science of Food and Agriculture, 94:2639 – 2648.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007). "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview". Food Research International, 40:1107-1121.

Gironés- Vilaplana A., Baenas N., Villaño D., Speisky H., García-Viguera C., Moreno D. (2014). "Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects". *Journal of Functional Foods*, 7: 599 – 608.

Giusti, M. M., y Wrolstad, R. E. (1996). "Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for maraschino cherries". *Journal of Food Science*, 61: 688-694.

Gong, Z., Zhang, M., Mujumbar, A.S. & Sun, J. (2007). "Spray drying and agglomeration of instant bayberry powder". *Drying Technology*, 26: 116–121.

González, B., H. Vogel, I. Razmilic y E. Wolfram (2015). "Polyphenol, anthocyanin and antioxidant content in different parts of maqui fruits (*Aristotelia chilensis*) during ripening and conservation treatments after harvest". *Industrial Crops and Products*, 76: 158-165.

Goula, A.M. y Adamopoulos, K.G. (2010). "A new technique for spray drying orange juice concentrate". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 342–351.

Grace M, Massey A, Mbeunkui F, Yousef G y Lila A. (2012). "Comparison of health-relevant flavonoids in commonly consumed cranberry products". *Journal of Food Science*, 77: 176–183.

Hoffmann A. (1997). "Flora silvestre de Chile, zona araucana. Enciclopedia de la flora Chilena". Búsqueda en línea: <http://www.florachilena.cl/especies.php?id=352> Julio de 2015.

Hur, S; Lim, B; Decker, E y McClements, D. (2011). "In vitro human digestion models for food applications". Food Chemistry. 125: 1 – 12.

Karaaslan, M.; Ozden, M.; Vardin, H.; Turkoglu, H. (2011) "Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts". LWT—Food Science and Technology., 44: 1065–1072.

Kim Y. y Morr C. (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.

Klaypradit, W. y Huang, Y. (2008). "Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer". LWT – Food Science and Technology, 41(6): 1133–1139.

Kraus M., Kahle K., Ridder F., Schantz M., Scheppach W., Schreier P. y Richling, E. (2010). "Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. In Flavor and health benefits of small fruits". American Chemical Society, 1: 159–176.

Laokuldilok T. y Kanha N. (2015). "Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying". LWT - Food Science and Technology, 64:405-411.

Lee J., Durst R., Wrolstad R. (2005) "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study". *Journal of AOAC International*, 88:1269-1278.

Lee J y Finn C. (2007). "Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:2665–2667.

Li X., Tang C. (2013). "Influence of glycation on microencapsulating properties of soy protein isolate–lactose blends". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93:2715–2722.

Lila M., Ribnicky D., Rojo L., Rojas-Silva P., Oren A., Havenaar R., Janle E., Raskin I., Yousef G., Grace M.(2012). "Complementary Approaches To Gauge the Bioavailability and Distribution of Ingested Berry Polyphenolics". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 5763–5771.

Lin Y., Shi R., Wang X., y Shen H. (2008). "Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy". *Current Cancer Drug Targets*, 8: 634-646.

Lucas-Gonzalez R., Navarro-Coves S., Pérez-Álvarez J. A., Fernández-López J., Muñoz L. A., Viuda-Martos M. (2016) "Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina)Stuntz) during *in vitro* gastrointestinal digestion". *Industrial Crops and Products*, 94: 774–782.

Mahdavi S., Jafari S. (2014). "Microencapsulation of anthocyanins by spray drying; a Review". *Dry Technology*, 32:509-518.

Mahdavi S., Jafari S., Assadpour E., Dehna D.(2016<sup>a</sup>) "Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin". *International Journal of Biological Macromolecules*, 85: 379–385.

Mahdavi S., Jafari S., Assadpour E., Ghorbani M. (2016<sup>b</sup>). "Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation". *Journal of Food Engineering*, 181: 59-66.

Malvern. (2017). "Malvern: Material Relationships- MASTERSIZER 3000 Smarter particle sizing". Pág. 4.

Marín E., Lemus R., Flores V., Vega A. (2006). "La rehidratación de alimentos deshidratados". *Revista Chilena de Nutrición*, 33:527-538.

McCabe W., Smith J., Harriott P. (1991) "Operaciones unitarias en Ingeniería química". ESPAÑA, McGraw-Hill interamericana. Cuarta edición. Capítulo 23: Reducción de tamaño pp. 891-912.

McDougall G., Fyffe S., Dobson P. y Stewart D. (2005). "Anthocyanins from red wine-Their stability under simulated gastrointestinal digestion". *Phytochemistry*, 66: 2540–2548.

Miranda-Rottmann, S.; Aspillaga, A.A.; Pérez, D.D.; Vasquez, L.; Martinez, A.L.; Leighton, F. (2002). "Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7542–7547.

Montenegro G. (2002). "Chile nuestra flora útil". Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Pp 123-124.

Mosele, J.I., Macià, A., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2016). "Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation". *Food Chemistry*, 201: 120–130.

Mosele, J.I., Macià, A., Romero, M.P., Motilva, M.J., Rubió, L. (2015). "Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds". *Journal of Functional Foods*, 14: 529–540.

Mosquera L. (2010). "Influencia de la humedad y de la adición de solutos (Maltodextrina o Goma arábica) en las propiedades fisicoquímicas de borjón y fresas en polvo-Tesis Doctoral". Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.



Oficina de Estudios y Políticas Agrarias ODEPA (2015). "Exportaciones de maqui chileno suben 168% y alcanzan los us\$4,4 millones entre enero y septiembre". Búsqueda en línea:<http://www.odepa.cl/noticia/exportaciones-de-maqui-chileno-suben-168-y-alcanzan-los-us44-millones-entre-enero-y-septiembre-elmercurio-com/>. 29 de Enero de 2016).

Oidtman J., Schantz M., Mäder K., Baum M., Berg S., Betz M. Kulozik U., Leick S., Rehage H. Schwarz K. y Richling E. (2012). "Preparation and Comparative Release Characteristics of Three Anthocyanin Encapsulation Systems". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 844–851.

Orrego C. (2003). "Procesamiento de Alimentos". Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Caldas, Colombia. Pág. 297.

Orrego C. (2008). "Congelación y Liofilización de alimentos". Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Caldas, Colombia. Pág.57.

Osborne D., Voogt P. (1986) "Análisis de los nutrientes de los alimentos". Zaragoza, España. Acribia S.A., 1986, Pág.258.

Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P. y Morales, A.L. (2010). "Microencapsulation by spray drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6977–6985.

Parzanese M. (2015). "Tecnología para la Industria Alimentaria: Liofilización de alimentos – Ficha N° 3". Alimentos Argentinos. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. MinAgri. Buenos Aires, Argentina. Pág. 1-12.

Pascual-Teresa S., Sánchez-Ballesta M. (2008). "Anthocyanins: from plant to health". *Phytochemistry Reviews*, 7:281–299.

Rein, M. (2005). "Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins". University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. Pág.87.

Rice-Evans C., Miller N. (1996). "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food". *Biochemical Society Transactions*, 24: 790–795.

Robert P., Fredes C. (2015). "The Encapsulation of Anthocyanins from Berry-Type Fruits". *Trends in Foods. Molecules*, 20:5875-5888.

Robert, P., García, P. and Fredes, C. (2017). "Drying and preservation of polyphenols. Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols (eds Valenzuela et al.)". CRC Press, Taylor and Francis Group, USA. 281-302.

Robert P., Gorena T., Romero N, Sepúlveda E., Chávez J., Saenz C. (2010). "Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying". *International Journal of Food Science and Technology*, 45:1386–1394.

Robert P., Torres V., García P., Vergara C., Saenz C. (2015). "The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents". LWT - Food Science and Technology, 60:1039-1045.

Rodríguez R., Matthei, O. y Quezada, M. (1983). "Flora arbórea de Chile". Editorial universitaria de Concepción, Chile. Pág. 408.

Rojo, L. E., D. Ribnicky, S. Logendra, A. Poulev, P. Rojas-Silva, P. Kuhn, R. Dorn, M. H. Grace, M. A. Lila, I. Raskin. (2012). "*In vitro* and *in vivo* anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*)". Food chemistry, 131(2): 387-396.

Rubilar, M., C. Jara, Y. Poo, F. Acevedo, C. Gutierrez, J. Sineiro y C. Shene (2011). "Extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) and murta (*Ugni molinae Turcz.*): sources of antioxidant compounds and  $\alpha$ -glucosidase/ $\alpha$ -amylase inhibitors." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(5): 1630-1637.

Ruiz A., Hermosín-Gutiérrez I., Mardones C., Vergara C., Herlitz E., Vega M., Dorau C., Winterhalter P., Von Baer D. (2010). "Polyphenols and antioxidant activity of Calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58:6081–6089.

Santana, A. Cano-Higuita, D., De Oliveira, R., Telis, V. (2016). "Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying". Food Chemistry, 212: 1–9.

Seeram N. (2008). "Beery fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:627-629.

Silva P., Stringheta P., Teófilo R. y de Oliveira I. (2013). "Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria. jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses". *Journal of Food Engineering*, 117: 538–544.

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

Sun-Waterhouse D., Zhou J. y Wadhwa S. (2013) "Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation". *Food Control*, 32: 450–460.

Tonon R., Brabet C., Hubinger M. (2010). "Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents". *Food Research International*, 43:907–914.

Tonon R., Brabet C., Pallet D., Brat P. y Hubinger M. (2009). "Physicochemical and morphological characterization of açai (*Euterpe oleraceae Mart.*) powder produced with different carrier agents". *International Journal of Food Science and Technology*, 44(10): 1950–1958.

Villacrez J., Carriazo J. y Osorio C. (2014). "Microencapsulation of Andes Berry (*Rubus glaucus Benth.*) aqueous extract by spray drying." *Food and Bioprocess Technology*, 7(5): 1445-1456.

Wagner J., Sorgentini D. y Añón C. (2000). "Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:3159–3165.

Wallace T. y Giusti M. (2008) "Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana L.* as compared to other natural/synthetic colorants". *Journal of Food Science*, 73: 241–248.

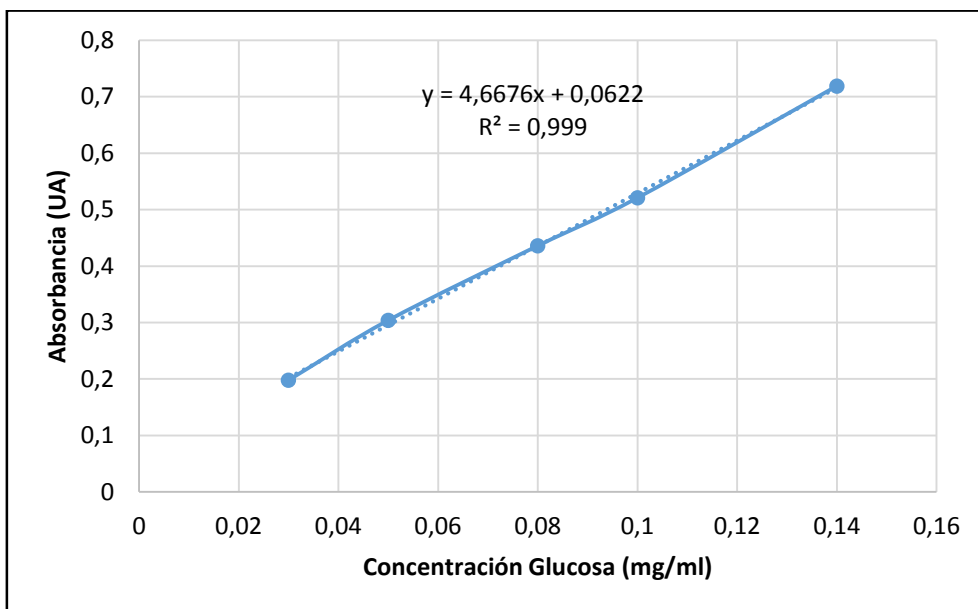
Wang Z., Li Y., Chen L., Xin X. y Yuan Q. (2013). "A study of controlled uptake and release of anthocyanins by oxidized starch microgels". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:5880-5887.

Yáñez J., Salazar J., Chaires L., Jiménez J., Márquez M. y Ramos E. (2002). "Aplicaciones acciones biotecnológicas de la microencapsulación". *Avance y Perspectiva*, 21:313-319.

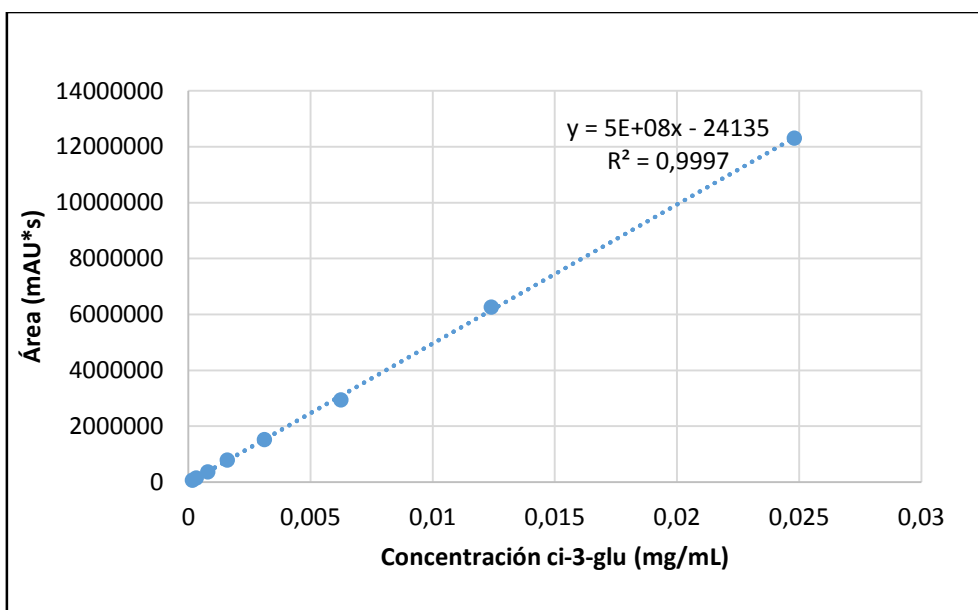
Young S., Sarda X. y Rosenberg M. (1993). "Microencapsulating properties of whey proteins. Combination of whey proteins with carbohydrates". *Journal of Dairy Science*, 76:2878–2885.

## Anexos

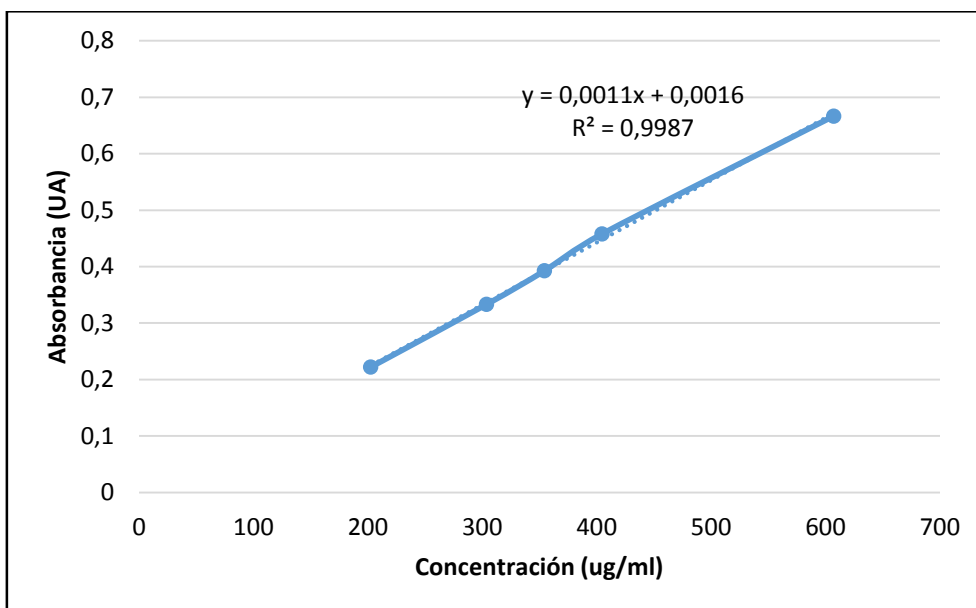
**Anexo 1. Curva de calibración de glucosa para cuantificación de azúcares totales en JM.**



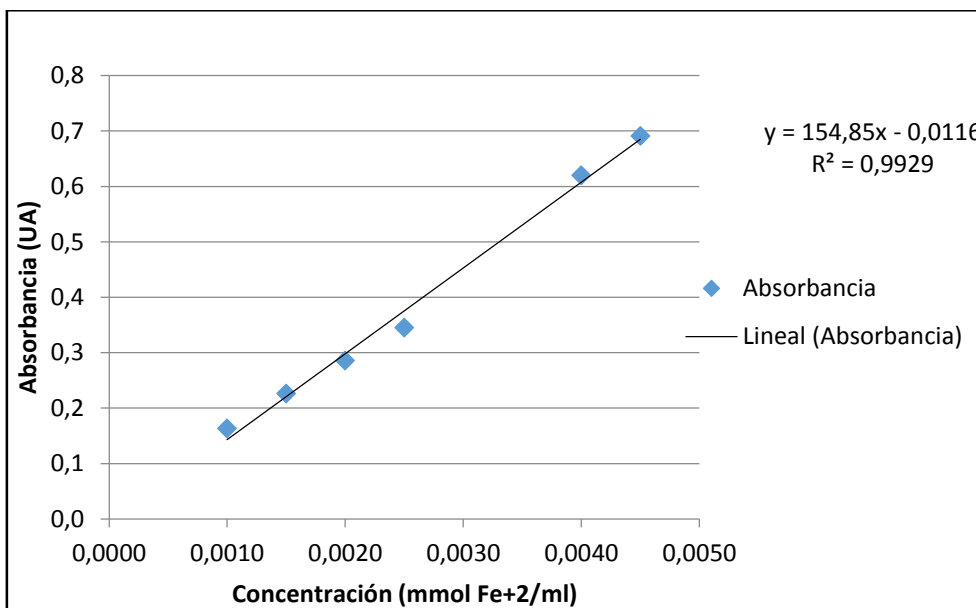
**Anexo 2. Curva de calibración cianidina-3-glucósido para cuantificación de AT e individuales.**



**Anexo 3. Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales en JM.**

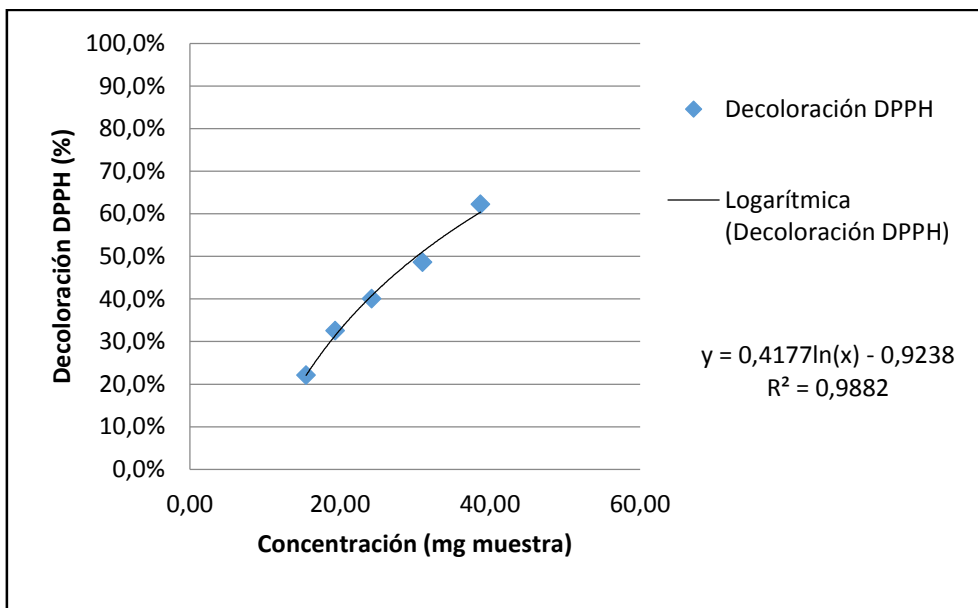


**Anexo 4. Curva de calibración de hierro para medir Actividad Antioxidante por FRAP.**

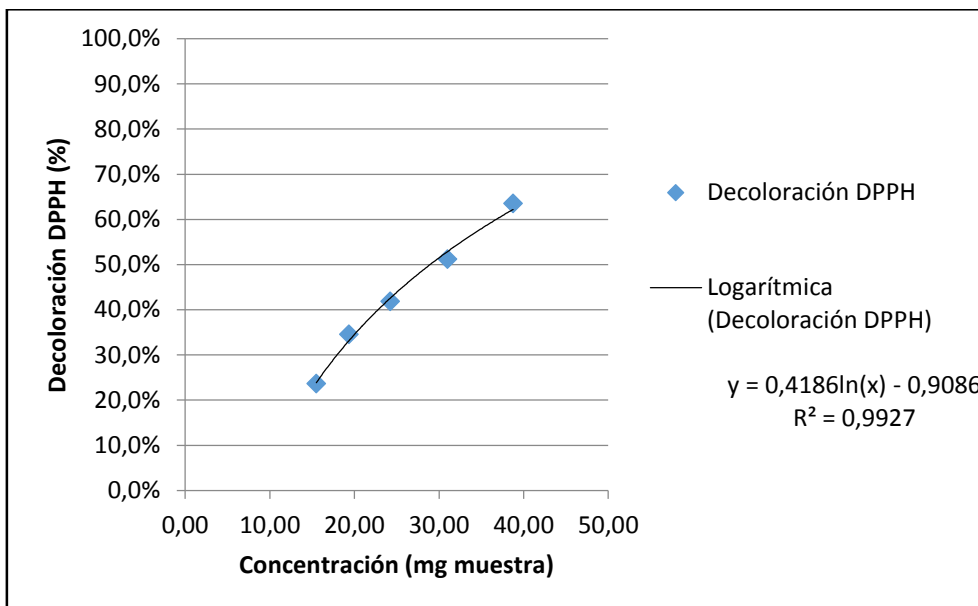


**Anexo 5. Curva de cinética de degradación del DPPH para medir Actividad Antioxidante (EC<sub>50</sub>). (a) Muestra 1, (b) Muestra 2.**

**(a)**



**(b)**





**Anexo 6. Descripción Yogur natural SOPROLE para estabilidad de micropartículas en yogur comercial.**

Ingredientes: Leche entera fluida, leche en polvo descremada, gelatina, sorbato de potasio y cepas de yogurt (*L. bulgaris*, *S. thermophilus*). Puede contener trazas de nueces.

Contenido neto: 155g.

<b>Información Nutricional</b>		
<b>Porción: 1 unidad (155g)</b>		
<b>Porciones por envase: 1</b>		
	<b>100g</b>	<b>1 porción</b>
<b>Energía (kcal)</b>	<b>70</b>	<b>109</b>
<b>Proteínas (g)</b>	<b>3,6</b>	<b>5,6</b>
<b>Grasa total (g)</b>	<b>3,1</b>	<b>4,8</b>
Grasa saturada (g)	2,2	3,4
Grasa monoinsat. (g)	0,8	1,2
Grasa poliinsat. (g)	0,1	0,16
Grasa trans (g)	0,0	0,0
<b>Colesterol (mg)</b>	<b>10,6</b>	<b>16,4</b>
<b>H de C disp. (g)</b>	<b>6,9</b>	<b>10,7</b>
Azúcares totales (g)	6,9	10,7
<b>Sodio (mg)</b>	<b>55</b>	<b>85</b>

Fabricación chilena. Elaborado, envasado y distribuido por SOPROLE S.A., Av. Pdte. J. Alessandri R. N°10.800, San Bernardo, Santiago. Res. S.S.A. N°019060 del 24.09.97. Región Metropolitana.

Conservar refrigerado entre 0 y 8°C. Una vez abierto el envase, su duración es de 4 d, manteniéndolo refrigerado. Consumir antes de la fecha indicada en el envase.

## Anexo 7. Información de ficha técnica JM 65 °Brix.

---

	Patagonol™ – LE
	65 Brix
<b>Brix</b>	65,0 ± 0,5
<b>Humedad</b>	32,9%
<b>pH</b>	3,50 – 4,00
<b>Acidez</b>	2,00 – 6,00% Ácido cítrico
<b>Densidad</b>	1,319 g/cm <sup>3</sup>
<b>Unidades de color</b>	1418
<b>Antocianinas</b>	18 – 24 mg/ml
<b>Composición de antocianinas</b>	Delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido Delfinidina-3,5-diglucósido Cianidina-3,5-diglucósido Cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido Delfinidina-3-sambubiósido Delfinidina-3-glucósido Cianidina-3-sambubiósido Cianidina-3-glucósido

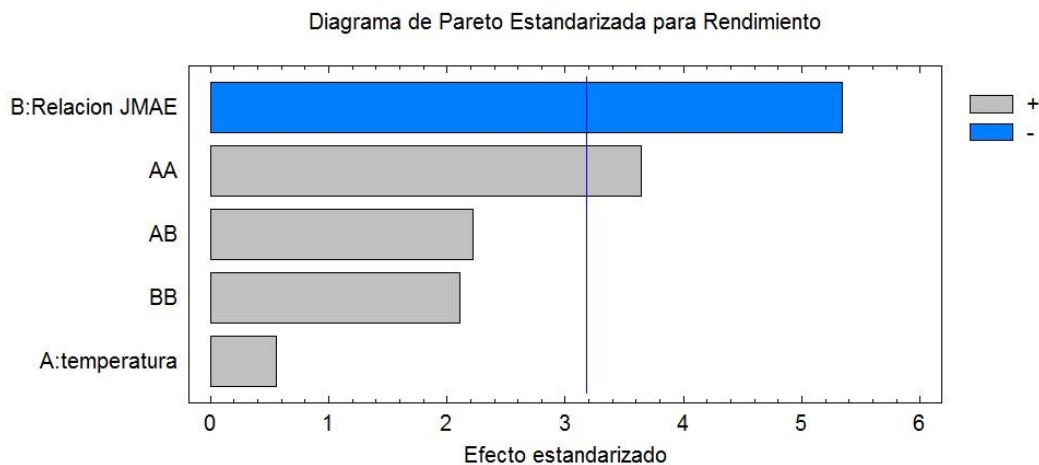
---

## Anexo 8. Condiciones experimentales, rendimiento y EE de AT e individuales para el diseño experimental de JM microencapsulado con MD y APS

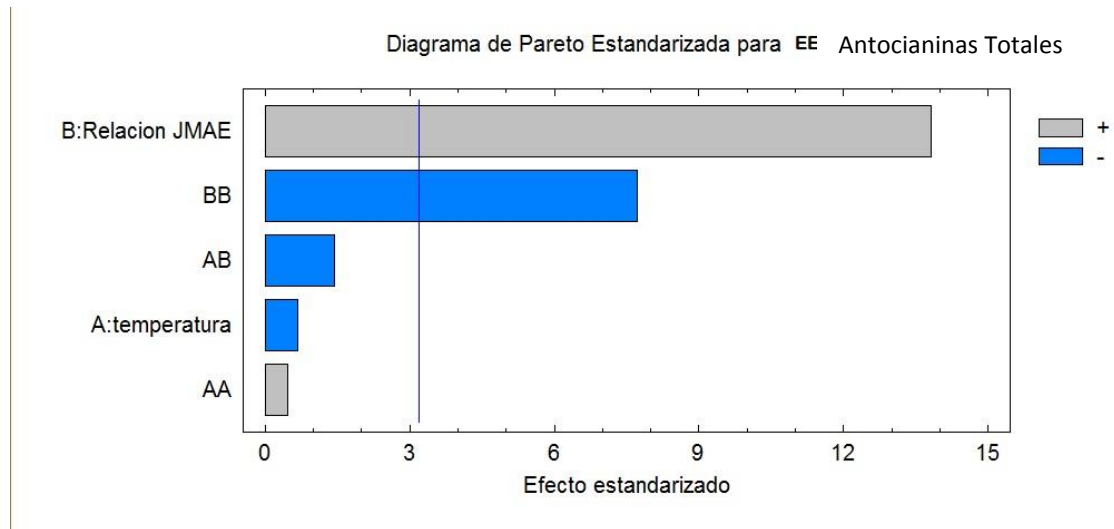
Experimento	Temperatura (°C)	Relación JM/AE	Rendimiento (%)	EE total (%)	EE Del-3-sa-5-glu (%)	EE Del-3,5-diglu (%)	EE Ci-3-sa-5-glu + Ci-3,5-diglu (%)	EE Del-3-sa (%)	EE Del-3-glu (%)	EE Ci-3-glu (%)
1	120	1:2	76,3	77,7	84	79,4	81,1	79,9	77,1	73,4
2	180	1:2	74,6	78,8	83,1	79	80,6	79	77,1	74,2
3	120	1:6	69,1	91,9	93,5	92,7	91,7	90,3	89,3	88,8
4	180	1:6	72,1	89,4	90,9	88,8	88,1	87,2	84,6	84,6
5	114	1:4	73,7	90,7	92,6	91,3	90,6	87,8	87,7	87,4
6	186	1:4	73,9	90	90,4	88,9	89,1	87,8	86,4	86,1
7	150	1:1,58	74,8	74,7	76,6	71,1	71,5	71,5	66,5	65,3
8	150	1:6,42	70,5	91,6	92,2	90,9	90,8	88,9	87,7	87,4
9	150	1:4	71	89,7	91	88,8	88,8	86,9	83,8	84,7
10	150	1:4	69,4	87,3	89,5	87,6	86,6	85,1	82,2	83,2
11	150	1:4	71,5	89,3	90,6	89,3	88,6	86,6	84,8	86,1
12	150	1:4	69,5	90,1	90,9	89,7	89,6	86	85,7	85

Del-3-sa-5-glu: delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido; Del-3,5-diglu: delfinidina-3,5-diglucósido; Ci-3-sa-5-glu: cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido; Ci-3,5-diglu: cianidina-3,5-diglucósido; Del-3-sa: delfinidina-3-sambubiósido; Del-3-glu: delfinidina-3-glucósido; Ci-3-glu: cianidina-3-glucósido.

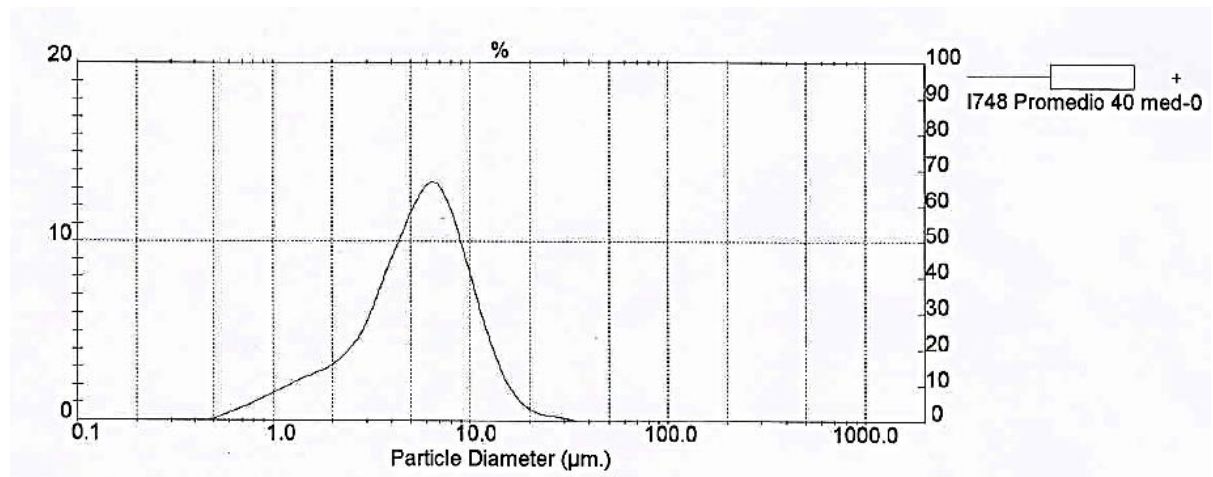
## Anexo 9. Diagrama de Pareto para Rendimiento



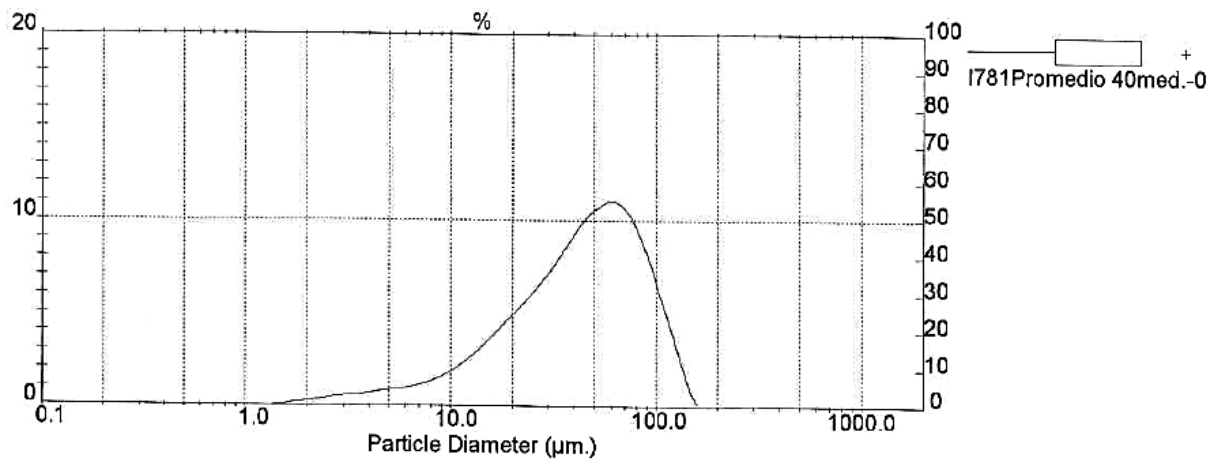
### Anexo 10. Diagrama de Pareto para EE de antocianinas totales



### Anexo 11. Distribución diámetro de partículas SA



### Anexo 12. Distribución diámetro de partículas LA



### Anexo 13. Distribución diámetro de partículas LB

