

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***MICROPARTÍCULAS DE PULPA DE TUNA ANARANJADA  
OPUNTIA FICUS-INDICA CON MUCÍLAGO DE NOPAL Y SU  
APLICACIÓN COMO COLORANTE EN ALIMENTOS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Doctor en Nutrición y Alimentos por:**

***JUAN CARLOS CARMONA RODRÍGUEZ***

**Directora de Tesis: Dra. Carmen Sáenz Hernández**

**Santiago, Chile**

**Diciembre 2020**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**JUAN CARLOS CARMONA RODRÍGUEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Nutrición y Alimentos, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Directora de Tesis:**

**Dra. Carmen Sáenz Hernández** \_\_\_\_\_

**Codirectora de Tesis:**

**Dra. Paz Robert Canales** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Lilian Abugoch** \_\_\_\_\_

**Dr. Rubén Bustos** \_\_\_\_\_

**Dr. Diego García** \_\_\_\_\_

**Dr. Mehrdad Yazdani-Pedram** \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

*A mi sobrino, Lois, porque su llegada a nuestras vidas nos trajo luz y alegría.*

*A mi madre, porque de ella son todos mis triunfos y mis derrotas.*

*“Hay un solo niño bello en el mundo y cada madre lo tiene”*

*José Martí*

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Juan Carlos Carmona Rodríguez, nacido en Cuba el 22 de septiembre de 1988. Realizó sus estudios secundarios en el IPVCE Mártires de Humboldt 7, egresando el año 2006. En el año 2007 comenzó sus estudios en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, obteniendo en julio de 2012 el título de Licenciado en Ciencias Alimentarias. Trabajó en el Centro de Investigaciones Pesqueras de La Habana, Cuba, hasta 2015 que ingresó al Doctorado en Nutrición y Alimentos de la Universidad de Chile. La tesis de Doctorado la realizó en los laboratorios de Productos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agronómicas y de Química de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Además, durante este período ha colaborado en actividades académicas, proyectos y tesis de pregrado.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que desde lejos siempre ha estado pendiente de mis avances y mis retrocesos. Especialmente a mi mamá y a mi hermano, de quienes apartarme no fue fácil y aún no lo es, a pesar de los años que han pasado.

A mis amigos, los de antes y los de ahora, los que vienen desde hace mucho y los que he conocido en Chile, porque cada uno ha sido muy importante para poder llegar a este punto: Gretel, Alan, Wendy, Julio, Isabel, Migdi, Yane, Orly, Julio, Pauli, Yusnier.

A César, por estar a mi lado en todo este camino, que no ha sido fácil ni sencillo, por apoyarme e insistirme para que no perdiera la fe ni la esperanza.

A mis compañeros de laboratorio, en la Facultad de Agronomía: Javiera y Alejandra y en la Facultad de Química y Farmacia: las Pauli, Cristián, Rudy. Por todo el tiempo que hemos pasado juntos, aprendiendo unos de otros.

A Anita Fabry y Elizabeth Apablaza, por acogerme en el laboratorio como un colega y apoyarme, cada una en su momento, para sacar adelante los análisis, sin importar los esfuerzos, las horas o el calor.

A las Dras. Carmen Sáenz y Paz Robert, por la asesoría, el tiempo dedicado, los consejos y las múltiples revisiones para que esta tesis llegara a término.

A la comisión evaluadora de tesis, por el tiempo dedicado a la revisión del proyecto, los avances y todos los consejos aportados para mejorar este trabajo.

A la Universidad de Chile y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por recibirme y darme la oportunidad de cursar este programa de doctorado. Y a las secretarías de posgrado, por el apoyo, la información y el asesoramiento en los procedimientos y beneficios, durante todos estos años.

A CONICYT por la Beca de Doctorado Nacional 2016-21160028.

A todos los que de alguna forma u otra me han apoyado, incentivado, inspirado o confiado en mí, porque cada gota de afecto, cuenta.

## ÍNDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ANEXOS .....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA.....	xv
RESUMEN .....	xvii
ABSTRACT .....	xix
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Colorantes naturales para alimentos.....	2
1.2. Compuestos bioactivos de interés presentes en los frutos amarillo-anaranjados de <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	4
1.3. Betaxantinas .....	6
1.3.1. Mecanismos de degradación de las betaxantinas .....	7
1.3.2. Factores que afectan la estabilidad de las betaxantinas.....	9
1.4. Microencapsulación de betaxantinas .....	11
1.5. Agentes encapsulantes.....	14
1.5.1. Maltodextrina .....	14
1.5.2. Mucílago de nopal.....	15
1.6. Aplicación de betaxantinas en alimentos.....	17
1.7. Hipótesis .....	19
1.8. Objetivos .....	19

1.8.1.	Objetivo general .....	19
1.8.2.	Objetivos específicos .....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>20</b>
<b>2.1.</b>	<b>Materiales .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.</b>	<b>Obtención y caracterización de la pulpa .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.</b>	<b>Obtención y caracterización del mucílago de nopal .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.</b>	<b>Optimización de la encapsulación de la pulpa de tuna.....</b>	<b>23</b>
2.4.1.	Preparación de las micropartículas .....	23
2.4.2.	Determinación de las variables respuesta .....	24
<b>2.5.</b>	<b>Caracterización de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6.</b>	<b>Estabilidad de las micropartículas en almacenamiento.....</b>	<b>25</b>
<b>2.7.</b>	<b>Estabilidad del color y los pigmentos en modelos de alimentos. 26</b>	
<b>2.8.</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>27</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>29</b>
<b>3.1.</b>	<b>Características físicas y químicas de la pulpa de tuna anaranjada (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.</b>	<b>Características físicas y químicas del mucílago de las paletas de <i>Opuntia ficus-indica</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.</b>	<b>Optimización de la encapsulación por secado por atomización de la pulpa de tuna anaranjada .....</b>	<b>34</b>
3.3.1.	Eficiencia de encapsulación de indicaxantina (EE) .....	38
3.3.2.	Rendimiento del proceso de secado (R) .....	40
3.3.3.	Función de Deseabilidad (D).....	43
<b>3.4.</b>	<b>Características de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5.</b>	<b>Estabilidad de las micropartículas almacenadas a 5, 37 y 60 °C . 50</b>	

3.6. Estabilidad del color y los pigmentos en modelos de alimentos.	59
3.6.1. Cinética de degradación de la indicaxantina en las bebidas .....	68
<b>CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72
<b>ANEXOS</b> .....	91

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables independientes y niveles del diseño compuesto central más punto axial para la encapsulación en los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD.....	24
Tabla 2. Formulación de la bebida refrescante con micropartículas de P-MD y P-M+MD como colorantes .....	27
Tabla 3. Características químicas y físicas de la pulpa de tuna anaranjada.....	29
Tabla 4. Características físicas y químicas del mucílago extraído de la paleta, secado por atomización y dispersado en agua .....	32
Tabla 5. Diseño experimental, variables respuestas y análisis de varianza para la encapsulación de la pulpa de tuna con maltodextrina (P-MD).....	35
Tabla 6. Diseño experimental, variables respuestas y análisis de varianza para la encapsulación de la pulpa de tuna con mucílago (P-M) .....	36
Tabla 7. Diseño experimental, variables respuestas y análisis de varianza para la encapsulación de la pulpa de tuna con la mezcla mucílago-maltodextrina (1:1) (P-M+MD).....	37
Tabla 8. Condiciones óptimas y respuestas esperadas en la encapsulación de pulpa de tuna anaranjada con MD, M y M+MD.....	45
Tabla 9. Características químicas y físicas de las micropartículas obtenidas a 150 °C y relación 3:1 de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD .....	47
Tabla 10. Índice de pardeamiento (inicial, final y variación) de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD almacenadas a 5, 37 y 60 °C.....	56
Tabla 11. Constantes de velocidad de degradación de las betaxantinas en las bebidas refrescantes almacenadas a 5 °C .....	68

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química general del ácido betalámico (a), las betacianinas (b) y las betaxantinas (c) (Azeredo, 2009). .....	6
Figura 2. Esquema de condensación del ácido betalámico (a) con la prolina (b), en la formación de la indicaxantina (c). Estructuras tomadas de Schwartz <i>et al.</i> (2017). .....	7
Figura 3. Hidrólisis alcalina y síntesis parcial de betaxantinas. R*=COOH en aminoácidos y H en aminas, respectivamente (Stintzing <i>et al.</i> , 2002). .....	8
Figura 4. Principales estereoisómeros de la indicaxantina identificados en solución acuosa (Stintzing <i>et al.</i> , 2006). .....	9
Figura 5. Representación esquemática simplificada de una micropartícula (microesfera) obtenida por secado por atomización. ....	12
Figura 6. Representación esquemática del diseño típico de un secador por atomización (Sandoval-Aldana <i>et al.</i> , 2004) (a) y del proceso de microencapsulación por secado por atomización (Bakry <i>et al.</i> , 2016) (b). .....	12
Figura 7. Representación esquemática bidimensional y tridimensional de la estructura de la maltodextrina (A.C.S., 2018). .....	14
Figura 8. Representación esquemática de la estructura parcial del mucílago de las paletas de nopal (McGarvie y Parolis, 1981b). .....	16
Figura 9. Apariencia externa y corte longitudinal del fruto (a) y pulpa extraída (b) de la tuna anaranjada. ....	30
Figura 10. Cromatogramas obtenidos por HPLC de la pulpa de tuna anaranjada a 484 nm (indicaxantina, imagen principal) y 535 nm (betanina, imagen pequeña insertada). .....	30
Figura 11. Paletas de nopal (a), mucílago extraído de las paletas (b) y secado por atomización (c). .....	33

Figura 12. Gráficos de superficie respuesta estimada para la eficiencia de encapsulación de indicaxantina (EE) en los sistemas de micropartículas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c). .....	39
Figura 13. Gráficos de superficie respuesta estimada para el rendimiento (R) en los sistemas de micropartículas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c). .....	42
Figura 14. Gráficos de superficie respuesta estimada para la función Deseabilidad (D) en los sistemas de micropartículas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c). .....	44
Figura 15. Micropartículas de pulpa de tuna anaranjada obtenidas en condiciones óptimas (150 °C y relación P/AE 3:1) de los sistemas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c). .....	49
Figura 16. Porcentaje de retención de indicaxantina de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas durante el almacenamiento a 5, 37 y 60 °C. ....	51
Figura 17. Cambio en los parámetros L*, C* y h° de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD durante las 7 semanas de almacenamiento a 5, 37 y 60 °C. ....	53
Figura 18. Variación de los parámetros de color ( $\Delta L^*$ , $\Delta C^*$ y $\Delta h^\circ$ ) entre el inicio y el fin del almacenamiento (7 semanas) de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5, 37 y 60 °C. ....	54
Figura 19. Variación del color ( $\Delta E^*$ ) de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas durante el almacenamiento a 5, 37 y 60 °C. ....	58
Figura 20. Diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) de los yogures de vainilla y las aguas saborizadas de pera adquiridos del comercio local con los yogures y las bebidas refrescantes con la adición de micropartículas de P-MD y P-M+MD, respectivamente. ....	60
Figura 21. Porcentaje de retención de indicaxantina de los yogures y las bebidas refrescantes coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD, almacenadas durante 28 días a $5 \pm 2$ °C. ....	61
Figura 22. Cambio en los parámetros L*, C* y h° de los yogures y las bebidas refrescantes coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD y los productos comerciales, almacenadas durante 28 días a 5 °C. ....	63
Figura 23. Variación de los parámetros de color ( $\Delta L^*$ , $\Delta C^*$ y $\Delta h^\circ$ ) entre el inicio y el fin del almacenamiento a 5 °C de los yogures y las bebidas refrescantes	

coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD y los productos comerciales. .... 64

Figura 24. Fotografías de los yogures y las bebidas refrescantes al inicio y final del almacenamiento a  $5 \pm 2$  °C. .... 65

Figura 25. Variación del color ( $\Delta E^*$ ) de los yogures y las bebidas refrescantes coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD y los productos comerciales, almacenadas durante 28 días a 5 °C. .... 66

Figura 26. Logaritmo natural del porcentaje de retención de indicaxantina vs. el tiempo de almacenamiento en refrigeración, de las bebidas refrescantes coloreadas con micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD. .... 68

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo I.</b> Publicaciones y presentaciones en congresos .....	91
<b>Anexo II.</b> Determinación del contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).....	93
<b>Anexo III.</b> Determinación del contenido de azúcares totales por el método de la Antrona (Osborne y Voogt, 1978).....	95
<b>Anexo IV.</b> Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ORAC (Dávalos <i>et al.</i> , 2004).....	97
<b>Anexo V.</b> Determinación del contenido de betalaínas por espectrofotometría (Stintzing <i>et al.</i> , 2005).....	99
<b>Anexo VI.</b> Optimización de la encapsulación del sistema P-MD mediante metodología de superficie respuesta .....	101
<b>Anexo VII.</b> Optimización de la encapsulación del sistema P-M mediante metodología de superficie respuesta .....	105
<b>Anexo VIII.</b> Optimización de la encapsulación del sistema P-M+MD mediante metodología de superficie respuesta .....	109
<b>Anexo IX.</b> Perfil de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las micropartículas de los sistemas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c) obtenidas a 150 °C y relación P/AE 3:1 .....	113
<b>Anexo X.</b> Variación de los parámetros de color ( $C^*$ , $L^*$ , $h^\circ$ y $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C.....	114
<b>Anexo XI.</b> Variación de los parámetros de color ( $C^*$ , $L^*$ , $h^\circ$ y $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C.....	116
<b>Anexo XII.</b> Variación de los parámetros de color ( $C^*$ , $L^*$ , $h^\circ$ y $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C.....	118

<b>Anexo XIII.</b> Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD .....	120
<b>Anexo XIV.</b> Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 37 °C de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD.....	121
<b>Anexo XV.</b> Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 60 °C de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD.....	122
<b>Anexo XVI.</b> Variación de los parámetros de color ( $C^*$ , $L^*$ , $h^\circ$ y $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el yogur comercial de vainilla.....	123
<b>Anexo XVII.</b> Variación de los parámetros de color ( $C^*$ , $L^*$ , $h^\circ$ y $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento a 5 °C de la bebida refrescante con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el agua saborizada de pera .....	125
<b>Anexo XVIII.</b> Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C de los alimentos con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD .....	127
<b>Anexo XIX.</b> Representación esquemática del espacio de color .....	129

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

**AE:** agente encapsulante

**ANDEVA:** análisis de varianza

**a\*:** componente del color rojo-verde

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

**b\*:** componente del color amarillo-azul

**BHA:** butilhidroxianisol

**C\*:** croma

**CAGR:** tasa de crecimiento anual compuesto

**CE:** comisión europea

**CFR:** código de regulaciones federales de los Estados Unidos

**D:** función de Deseabilidad

**DCC:** diseño compuesto central

**DSC:** calorimetría diferencial de barrido

**EAG:** equivalente a ácido gálico

**ED:** equivalentes de dextrosa

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EE:** eficiencia de encapsulación

**EI:** equivalente a indicaxantina

**EB:** equivalente a betanina

**ET:** equivalente a Trolox

**FDA:** administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos

**g.l.:** grados de libertad

**HPLC:** cromatografía líquida de alta presión

**h°:** tono

**IP:** índice de pardeamiento

**L\***: luminosidad  
**M**: mucílago de nopal  
**MD**: maltodextrina  
**MR**: mucílago de nopal secado por atomización dispersado en agua  
**MS**: mucílago de nopal secado por atomización  
**MSR**: metodología de superficie respuesta  
**NaCl**: cloruro de sodio  
**ORAC**: capacidad de absorción de radicales de oxígeno  
**P**: pulpa de tuna anaranjada  
**P/AE**: relación pulpa de tuna/agente encapsulante  
**P-MD**: sistema de micropartículas de pulpa con maltodextrina  
**P-M**: sistema de micropartículas de pulpa con mucílago  
**P-M+MD**: sistema de micropartículas de pulpa con mucílago-maltodextrina  
**R**: rendimiento  
**R<sup>2</sup>**: coeficiente de determinación  
**T**: temperatura del aire a la entrada del secador  
**T<sub>g</sub>**: temperatura de transición vítrea  
**ΔC\***: variación de la croma  
**ΔE\***: cambio total de color  
**Δh°**: variación del tono  
**ΔIP**: variación en el índice de pardeamiento  
**ΔL\***: variación de la luminosidad

## RESUMEN

El empleo de colorantes naturales ha ganado interés como sustituto de los colorantes sintéticos o artificiales, que se consideran dañinos para la salud de los consumidores. La indicaxantina de la pulpa de la tuna anaranjada (*Opuntia ficus-indica*) podría ser un colorante natural para alimentos de naturaleza hidrosoluble, que podría aplicarse en una amplia variedad de productos. El empleo de la microencapsulación por secado por atomización de la pulpa de tuna anaranjada, con mucílago de nopal y maltodextrina como agentes encapsulantes, podría garantizar la estabilidad de la indicaxantina, favoreciendo su almacenamiento y funcionamiento como colorante para alimentos.

En este estudio se determinaron las condiciones óptimas de encapsulación mediante secado por atomización de la pulpa de tuna anaranjada (P), usando mucílago de nopal (M), maltodextrina (MD) y una mezcla de mucílago-maltodextrina (M+MD) como agentes encapsulantes, para determinar el efecto del polímero en las características, estabilidad en almacenamiento y como colorantes en dos alimentos (yogur y bebida refrescante). La temperatura del aire de entrada al secador (T) y la relación pulpa/agente encapsulante (P/AE) fueron las variables independientes. La eficiencia de encapsulación de indicaxantina (EE) y el rendimiento del proceso (R) fueron las variables dependientes.

Durante la optimización de la encapsulación los tres sistemas de micropartículas (P-MD, P-M y P-M+MD) tuvieron eficiencias de encapsulación de indicaxantina mayores a 70%, debido a interacciones indicaxantina-polímero por interacciones electrostáticas y/o formación de puentes de hidrógeno. El rendimiento estuvo entre 40% – 62% en P-MD, entre 4% – 11% en P-M y entre 5% – 32% en P-M+MD. De modo general, la relación P/AE tuvo mayor influencia que la temperatura durante el proceso de encapsulación y las condiciones óptimas fueron T= 150 °C y relación P/AE 3:1. En estas condiciones, la eficiencia de encapsulación y el rendimiento del proceso fueron 100% y 51,2% (P-MD), 87% y 7% (P-M) y 93% y 11% (P-M+MD), respectivamente. Todos los sistemas de micropartículas tuvieron baja humedad (menor a 7%) y actividad de agua (menor a 0,3), y una alta solubilidad (mayor a 90%), lo que posibilitaría su almacenamiento y aplicación en formulaciones de alimentos de naturaleza acuosa.

Las micropartículas se almacenaron durante 7 semanas a 5, 37 y 60 °C, observándose una mayor estabilidad de la indicaxantina y el color a baja temperatura. A 60 °C, el sistema P-MD mostró la mayor estabilidad de la indicaxantina, con una retención de 89%, mientras que a 5 y 37 °C, P-MD y P-M+MD mostraron una retención mayor al 95%. Respecto al color, a 5 °C se obtuvo un  $\Delta E^* < 2$  en los tres sistemas; sin embargo, un cambio de color perceptible ocurrió a 37 °C en P-M y P-M+MD, y en los tres sistemas a 60 °C. Por tanto, las micropartículas deberán ser almacenadas a baja temperatura para garantizar la estabilidad del color y la indicaxantina

Los sistemas P-MD y P-M+MD se agregaron como colorantes a un yogur natural y a una bebida refrescante y se compararon con productos comerciales. En el yogur, ambos colorantes mostraron similar estabilidad de la indicaxantina y el color, con una retención mayor al 80% y un  $\Delta E^* < 1$ . En la bebida refrescante, el colorante P-MD fue más estable con una retención de indicaxantina de 12%, mientras que la retención en P-M+MD fue de 7,4%, después de 28 días en almacenamiento refrigerado. En ambas bebidas el cambio de color estuvo cercano a 6. Las diferencias entre los alimentos (composición, pH) explicarían estos resultados obtenidos. Las micropartículas de pulpa de tuna anaranjada podrían ser empleadas como colorantes amarillos en la industria de alimentos como sustituto de los colorantes sintéticos.

## ABSTRACT

The use of natural colorants has raised interest as substitutes for synthetic or artificial dyes, which are considered harmful to the consumers' health. Indicaxanthin from the pulp of orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) could be a natural food colorant of a water-soluble nature, which could be applied in a wide range of products. The microencapsulation by spray drying of the orange cactus pear pulp, with nopal mucilage and maltodextrin as encapsulating agents, could ensure the stability of indicaxanthin, enhancing its storage and performance as a food coloring.

In this study, the optimal conditions of encapsulation by spray drying of orange cactus pear pulp (P) were determined, using nopal mucilage (M), maltodextrin (MD), and a mucilage-maltodextrin blend (M+MD) as encapsulating agents, to determine the effect of the polymer on the microparticle's characteristics. Stability during storage and as a colorant in two products (yogurt and soft drink) were also determined. The dryer inlet air temperature (T) and the pulp/encapsulating agent ratio (P/AE) were the independent variables. Indicaxanthin encapsulation efficiency (EE) and process yield (R) were the dependent variables.

During the encapsulation optimization, the three microparticle systems (P-MD, P-M, and P-M+MD) showed indicaxanthin encapsulation efficiencies higher than 70%, due to indicaxanthin-polymer interactions by electrostatic interactions and/or hydrogen bonds formation. The yield ranged from 40% – 62% for P-MD, from 4% – 11% for P-M, and 5% – 32% for P-M+MD. In general, the P/AE ratio had a greater influence than the temperature in the encapsulation process and the optimal conditions were air inlet temperature, T= 150 °C, and 3:1 P/AE ratio. Under these conditions, the encapsulation efficiency and yield were 100% and 51.2% (P-MD), 87% and 7% (P-M), and 93% and 11% (P-M+MD), respectively. All the microparticle systems showed low moisture (less than 7%) and water activity (less than 0.3), and a high solubility (over 90%), which would allow them to be stored and applied in aqueous food formulations.

Microparticles were stored for 7 weeks at 5, 37, and 60 °C, showing greater indicaxanthin and color stability at low temperatures. At 60 °C, the P-MD system showed the highest indicaxanthin stability, with 89% retention, while at 5 and 37 °C, P-MD, and P-M+MD exhibited retention of over 95%. Regarding color, at 5 °C a  $\Delta E^* < 2$  was obtained in the three systems; however, a perceptible color change

occurred at 37 in P-M and P-M+MD as well as at 60 °C in the three systems. Therefore, microparticles should be stored at low temperatures to ensure the stability of color and indicaxanthin.

The P-MD and P-M+MD systems were added as colorants to natural yogurt and a soft-drink and compared to commercial products. In the yogurt, both colorants showed similar indicaxanthin and color stability, with retention higher than 80% and a  $\Delta E^* < 1$ . In the soft-drink, the P-MD colorant was more stable with 12% indicaxanthin retention, while the P-M+MD retention was 7.4%, after 28 days in refrigerated storage. In both beverages, the color change was close to 6. The differences between the food matrices (composition, pH) would explain these obtained results. Microparticles of orange cactus pear pulp could be used as yellow colorants in the food industry as a substitute for synthetic dyes.

## INTRODUCCIÓN

El uso de colorantes amarillos de origen sintético o artificial como la tartrazina (E-102), el amarillo de quinoleína (E-104) y el amarillo crepúsculo (E-110) está siendo cuestionado y restringido en la industria de alimentos, principalmente en Europa y Estados Unidos (EFSA, 2009a, b, 2014; FDA, 2020), por sus efectos dañinos a la salud humana (Hassan, 2009; Teixeira y Peres, 2009; Swaroop *et al.*, 2011), lo que ha provocado un creciente interés por el empleo de colorantes amarillos de origen natural.

Adicionalmente, las restricciones al comercio de colorantes sintéticos en varias regiones como Europa y Japón, ha dado lugar a una menor fabricación de algunos de estos. Este factor ha intensificado la demanda de colorantes naturales para alimentos en varias industrias, con un impacto positivo en el mercado, con una proyección a 1657,7 millones de dólares a finales de 2023 (Researchnester.com, 2020).

Dentro de los pigmentos naturales amarillos empleados actualmente en la industria de alimentos se encuentran la cúrcuma (E-100), el annato (E-160b), el  $\beta$ -caroteno (E-160a) y otros carotenoides, que tienen una baja solubilidad en agua, lo que limita su aplicación en una amplia gama de alimentos acuosos (Azeredo, 2009). En este contexto, las betaxantinas de la tuna anaranjada (*Opuntia ficus-indica*) podrían emplearse en alimentos como una nueva fuente natural de colorantes amarillos de naturaleza hidrosoluble (Fernández-López *et al.*, 2018).

Además, el consumo de tunas anaranjadas se ha asociado con efectos positivos a la salud, debido a la presencia tanto de betaxantinas como de polifenoles, ambos con actividad antioxidante (Galati *et al.*, 2003; Tesoriere *et al.*, 2004b). De esta forma, el empleo de la pulpa de tunas anaranjadas como colorante tendría una doble función, impartir color a partir de una fuente natural y aportar compuestos con capacidad antioxidante a los alimentos donde se incluyan (Stintzing y Carle, 2004; Matulka y Tardy, 2014).

Sin embargo, betaxantinas y polifenoles son susceptibles a degradación frente a factores ambientales como luz, oxígeno, temperatura, humedad y pH (Azeredo, 2009). En este contexto, la aplicación de la tecnología de microencapsulación constituye una alternativa promisoriosa para lograr estabilizar estos compuestos

bioactivos. Esta tecnología ha sido aplicada satisfactoriamente a otros compuestos bioactivos similares como las betacianinas (Sáenz *et al.*, 2009; Vergara *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2015).

La selección de un agente encapsulante que permita la estabilización eficiente de los compuestos bioactivos, así como su retención una vez que sean aplicados como colorantes en alimentos, constituye un desafío.

El nopal es una planta de bajo requerimiento hídrico y fácil cultivo (Sáenz *et al.*, 2006), donde la paleta es un desecho de la poda. El mucílago extraído de la paleta del nopal es una fuente de fibra soluble que podría ser empleada como agente encapsulante (Medina-Torres *et al.*, 2013; Otálora *et al.*, 2015).

### **1.1. Colorantes naturales para alimentos**

El tamaño del mercado mundial de colorantes naturales para alimentos se calculó en 1320 millones de dólares en 2015 (GrandViewInc, 2017), alcanzando 1500 millones en 2017 (Hexaresearch, 2018). Se estima que factores como el surgimiento de industrias alimentarias debido al aumento de la población y su necesidad diaria de alimentos, junto con la creciente conciencia de la población respecto de las ventajas de los colorantes naturales y el número cada vez mayor de productos alimenticios, ampliarán el mercado mundial de los colorantes naturales para alimentos con un crecimiento anual (CAGR) del 5,8% en el período previsto de 2018 a 2023 (Researchnester.com, 2020).

Este incremento se debe a que los consumidores valorizan los colorantes de origen natural, respecto de los sintéticos, pues los consideran inocuos (Stintzing y Carle, 2004; Stintzing *et al.*, 2005; Herbach *et al.*, 2006; Azeredo, 2009; Rymbai *et al.*, 2011; Lippert, 2016). Además, ha aumentado la disposición a pagar más por colorantes de origen natural, que pueden aportar beneficios a la salud (Nielsen, 2015; Lippert, 2016).

De particular interés son los colorantes naturales amarillos, ya que los de origen sintéticos se han asociado con efectos nocivos para la salud. Un estudio realizado por McCann *et al.* (2007) evaluó la relación entre el consumo de aditivos alimentarios y la aparición de hiperactividad en niños. Entre los aditivos estudiados se encontraban colorantes amarillos sintéticos como el amarillo crepúsculo y la tartrazina. Los autores reportaron un incremento en la hiperactividad tras el consumo de los aditivos evaluados, aunque por tratarse de mezclas, no pudieron asociar el comportamiento con algún aditivo alimentario en particular.

Asimismo, la presencia de colorantes amarillos sintéticos (tartrazina) se ha asociado con casos de alergia en diferentes medicamentos que los contienen

(Bhatia, 1996; Bhatia, 2000). La relación de la tartrazina y el amarillo crepúsculo con la ocurrencia de dermatitis atópica, urticaria y angioedema también ha sido reportada (Bourrier, 2006; Teixeira y Peres, 2009). Además, se han reportado otros efectos asociados al uso de colorantes sintéticos como genotoxicidad y carcinogénesis, debidas a la presencia de bencidina y otros carcinógenos (Hassan, 2009; Swaroop *et al.*, 2011; Kobylewski y Jacobson, 2012). Amin *et al.* (2010) encontraron que la tartrazina producía un efecto tóxico en la función renal y hepática. Khayyat *et al.* (2017) encontraron efectos genotóxicos, alteraciones celulares e histopatológicas en hígado y riñones de ratas, asociado a la administración de tartrazina, además de una disminución del nivel de antioxidantes totales en sangre. Los autores concluyeron que el consumo de tartrazina presentaba efectos adversos a la salud. Estos antecedentes impulsan aún más el estudio de colorantes amarillo-anaranjados naturales, como aditivos alimentarios.

Por otro lado, se ha venido desarrollando el concepto de “alimento colorante” (*coloring food*), fundamentalmente en países europeos. La Comisión Europea (CE) ha publicado una guía para la clasificación de alimentos o extractos de estos, como alimentos con propiedades colorantes llamados “alimentos colorantes” (no aditivos alimentarios) (EC, 2013; Collins, 2014; Matulka y Tardy, 2014). Para que un producto sea considerado como alimento colorante en la Unión Europea, debe ser un alimento habitualmente consumido como tal, o un ingrediente característico para alimentos. Además, en el caso de los extractos, para ser considerados dentro de esta categoría, al pasar por un proceso de obtención (física o química), no deben perder las características (nutritivas y/o aromáticas) del alimento de donde provienen (EC, 2013). Si un alimento o extracto se clasifica como alimento colorante, no deberá ser indicado como aditivo en el listado de ingredientes (EC, 2008, 2011, 2013; Collins, 2014). Desde el punto de vista de una alimentación saludable, esto presenta un especial atractivo para los consumidores.

Por su parte, en Estados Unidos, el Código de Regulaciones Federales (CFR) de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) regula la declaración de colorantes e ingredientes en el etiquetado. Los colorantes que además son condimentos (cúrcuma, azafrán, páprika) se declararán mediante su nombre común o real en la etiqueta, mediante el término “condimento y colorante”. Mientras que los colorantes exentos de certificación, como los jugos vegetales, se declararán mediante su nombre común o usual específico (“colorante de caramelo”, “coloreado con jugo de remolacha”) (FDA, 2020).

Entre los pigmentos amarillos naturales utilizados hoy en día en la industria de alimentos se encuentran la cúrcuma (E-100), el annato (E-160b), el  $\beta$ -caroteno (E-160a) y otros carotenoides extraídos de diversas fuentes (Griffiths, 2005; Rymbai *et al.*, 2011; Giménez *et al.*, 2015). A pesar de que todos ellos están aprobados por la Unión Europea y Estados Unidos (EC, 2008; Barrows *et al.*,

2014), tienen la desventaja de su escasa solubilidad en agua, debido a su naturaleza hidrofóbica (Moßhammer *et al.*, 2005a, b; Azeredo, 2009; FDA, 2020). Por otro lado, la extracción de estos compuestos generalmente involucra el uso de solventes, purificación química y el empleo de estabilizantes y preservantes. Esto obliga a indicarlos como aditivos alimentarios cuando se adicionan a alimentos (Griffiths, 2005; Barrows *et al.*, 2014).

En este contexto, los frutos anaranjados de las tunas, especie *Opuntia ficus-indica*, constituyen materias primas con potencial para ser usados como fuente de colorantes naturales, catalogados como alimentos colorantes, debido a la presencia de betaxantinas (betalaínas amarillas), solubles en agua (Fernández-López y Almela, 2001; Stintzing *et al.*, 2005). Estudios realizados hasta ahora indican que a partir de los frutos amarillo-anaranjados de tunas se han elaborado jugos concentrados y jugos en polvo no encapsulados (Moßhammer *et al.*, 2005b, 2006c), los cuales han mostrado una alta retención de los pigmentos y el color, proyectando a las tunas anaranjadas como materia prima en la obtención de colorantes para alimentos.

## **1.2. Compuestos bioactivos de interés presentes en los frutos amarillo-anaranjados de *Opuntia ficus-indica***

La tuna es el fruto del nopal, planta originaria de América de la familia *Cactaceae*, ampliamente distribuida en México, Latinoamérica, el sur de África y la cuenca del Mediterráneo (Sáenz y Sepúlveda, 2001a; Butera *et al.*, 2002; Cota-Sánchez, 2016). Existen más de 300 especies entre las que se destaca *Opuntia ficus-indica*, que a su vez tiene variedades con frutos rojos-púrpura, rosados y amarillo-anaranjados, según el tipo y contenido de betalaínas (Sáenz y Sepúlveda, 2001b; Sáenz *et al.*, 2006; Cota-Sánchez, 2016; Khan, 2016). La parte comestible de la tuna está compuesta por semillas (~ 15%) y pulpa (~ 85%) (Ramadan y Morsel, 2003a, b; Chougui *et al.*, 2013), siendo la pulpa la base para preparar salsas, jarabes, bebidas alcohólicas y jugos, entre otros (Moßhammer *et al.*, 2006b). En Chile existen aproximadamente 766,6 hectáreas cultivadas; principalmente de la variedad verde, por ser la que se comercializa y consume a nivel nacional como fruta fresca. Las regiones Metropolitana (538,0) de Valparaíso (117,1) y de Coquimbo (90,5), en ese orden, concentran la mayor parte de los cultivos de nopal (ODEPA, 2019). No existen hasta ahora, plantaciones comerciales de tunas anaranjadas en Chile, en parte por su desconocimiento y por la sensación harinosa al paladar de los frutos, que los hace poco apetecibles para su consumo como fruta fresca, abriendo aún más sus posibilidades de transformación industrial (Sáenz *et al.*, 2006).

En los últimos años, varios estudios se han enfocado en las propiedades funcionales de esta planta debido a la presencia de compuestos bioactivos

(Trejo-González *et al.*, 1996; Ramadan y Morsel, 2003b, c; Stintzing y Carle, 2004; Stintzing *et al.*, 2005; Saih *et al.*, 2017). Betalainas, polifenoles, fibra dietaria (mucílago), ácido ascórbico, aminoácidos (prolina, glutamina y taurina) y también minerales se han reportado (Stintzing *et al.*, 2001). Sus potenciales beneficios, favorecen su aprovechamiento en la formulación de nuevos alimentos funcionales (Stintzing *et al.*, 2001; Stintzing y Carle, 2004).

El contenido de polifenoles totales reportados en las tunas anaranjadas varía entre  $247 \pm 23,1$  y  $746 \pm 16$  mg EAG L<sup>-1</sup> (Galati *et al.*, 2003; Stintzing *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2009). Este amplio rango en el contenido en polifenoles se puede atribuir a las diferencias en ubicación geográfica, clima y variedades estudiadas (Cota-Sánchez, 2016). Se ha identificado la presencia de flavonoides como quercetina, kaempferol y derivados de isoramnetina (Galati *et al.*, 2003; Jiménez-Aguilar *et al.*, 2014; Moussa-Ayoub *et al.*, 2014; Mata *et al.*, 2016). Al igual que las betalainas y otros compuestos bioactivos, su consumo se ha asociado con beneficios a la salud, principalmente en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como cáncer y enfermedades cardiovasculares, por su potencial antioxidante (Tesoriere *et al.*, 2004a; Tesoriere *et al.*, 2004b).

La capacidad antioxidante de polifenoles, betalainas y otros compuestos bioactivos de tunas y paletas de nopal se ha evaluado por varios autores (Galati *et al.*, 2001; Butera *et al.*, 2002; Galati *et al.*, 2002; Galati *et al.*, 2003; Kugler *et al.*, 2007; Lanuzza *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2017; Bargougui *et al.*, 2019). La capacidad antioxidante de los frutos ha sido reportada como comparable a la de naranjas y uvas, debido a la acción sinérgica de betalainas, polifenoles, flavonoides y otros compuestos con actividad biológica (Barba *et al.*, 2020). Tesoriere *et al.* (2004b) reportaron que el consumo de tunas afectaba positivamente el balance redox del organismo y disminuía el daño oxidativo de los lípidos. Tanto las betalainas como los polifenoles se asociaron a estos beneficios, por su capacidad antioxidante.

Por otra parte, tanto frutos como paletas han mostrado algunos efectos antimicrobianos y antidiabéticos, mejorando parámetros metabólicos (Barba *et al.*, 2020) y otros potenciales beneficios a la salud, como: propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras (Allegra *et al.*, 2017; Saih *et al.*, 2017; Gambino *et al.*, 2018), antiulcerogénicas (Galati *et al.*, 2001; Galati *et al.*, 2003), anticarcinogénicas, antiaterogénicas, hipoglicémicas, inmunomoduladoras, hepatoprotectoras y analgésicas (Chauhan *et al.*, 2010; Jiménez-Aguilar *et al.*, 2014).

La presencia de polifenoles, flavonoides y taninos en las paletas de nopal posibilitaría el empleo de las paletas como fuente de compuestos antioxidantes para el desarrollo de ingredientes y alimentos saludables (Allai *et al.*, 2017) con potencial efecto citoprotector y antihipercolesterolémico (Harrabi *et al.*, 2017),

debido a su contenido de fibra dietaria insoluble y soluble (Astello-García *et al.*, 2015).

La mayor parte de la fibra soluble está constituida por el mucílago (~ 93%) (Sáenz *et al.*, 2004), con capacidad de modificar texturas y mejorar la estabilidad de los alimentos durante la producción y almacenamiento (Contreras-Padilla *et al.*, 2012), así como de proveer efectos fisiológicos beneficiosos para la salud humana, tales como disminución del colesterol en sangre, control de niveles de glucosa, cáncer de colon, hemorroides o constipación crónica (Sáenz *et al.*, 2004). El mucílago también ha mostrado capacidad como eliminador de radicales (Bayar *et al.*, 2016), así como protector del daño inducido a la célula en procesos de digestión gastrointestinal y fermentación colónica (Barba *et al.*, 2020).

### 1.3. Betaxantinas

Las betaxantinas, de color amarillo, se componen de un ácido betalámico condensado con aminas o aminoácidos. El otro grupo de betalainas, las betacianinas, de color rojo, tienen un ácido betalámico, pero condensado con un ciclo-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) o sus derivados glicosilados (Figura 1). Las betaxantinas absorben en el espectro de luz visible a los 480 nm y las betacianinas a 535 nm (Fernández-López y Almela, 2001; Azeredo, 2009; Fernández-López *et al.*, 2012; Khan y Giridhar, 2015; Slimen *et al.*, 2017).

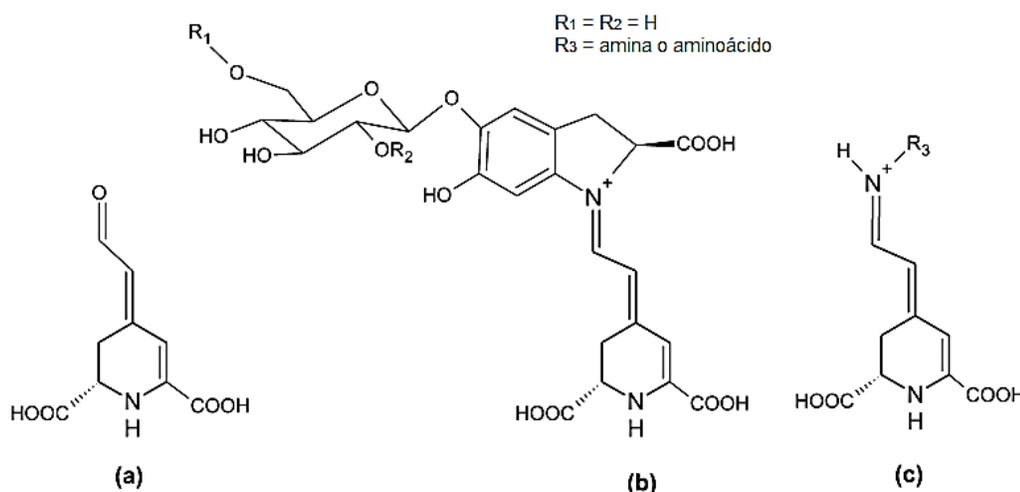


Figura 1. Estructura química general del ácido betalámico (a), las betacianinas (b) y las betaxantinas (c) (Azeredo, 2009).

En los ecotipos de tunas anaranjadas las betaxantinas son el principal componente, responsable del color amarillo-anaranjado de la fruta, y en menor

proporción se encuentran las betacianinas de color rojo-púrpura (Fernández-López y Almela, 2001; Stintzing *et al.*, 2005). En estos ecotipos anaranjados se han reportado concentraciones de betaxantinas entre 8 – 25 g kg<sup>-1</sup> de pulpa (Fernández-López y Almela, 2001; Butera *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2019).

La principal betaxantina identificada en los frutos amarillo-anaranjados de *Opuntia ficus-indica*, es la indicaxantina, correspondiente a un ácido betalámico conjugado al aminoácido prolina por un enlace aldímico (Figura 2) (Stintzing *et al.*, 2002; Badui, 2006; Liveri *et al.*, 2009; Schwartz *et al.*, 2017).

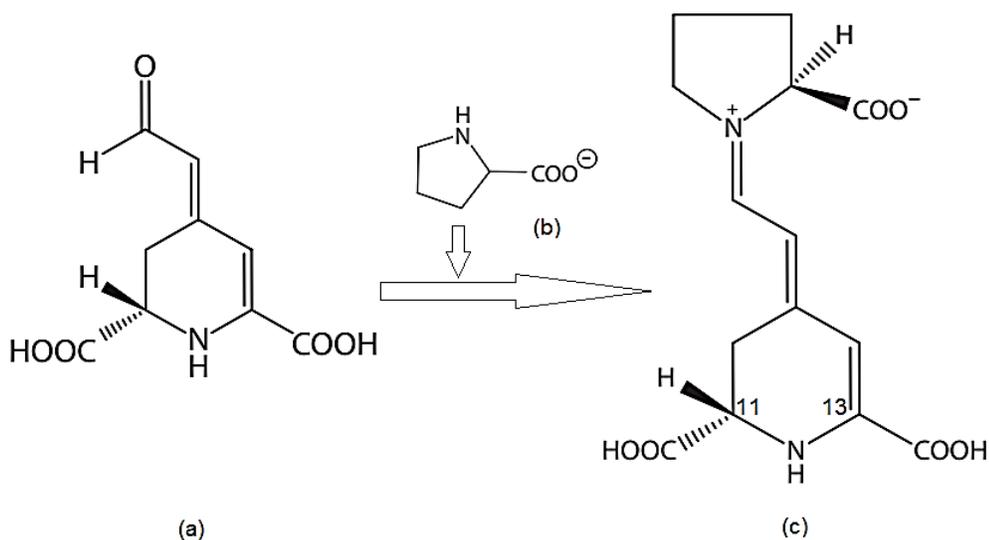


Figura 2. Esquema de condensación del ácido betalámico (a) con la prolina (b), en la formación de la indicaxantina (c). Estructuras tomadas de Schwartz *et al.* (2017).

### 1.3.1. Mecanismos de degradación de las betaxantinas

Los mecanismos de degradación de las betacianinas están bien documentados. Sin embargo, las betaxantinas han sido menos estudiadas. Considerando que betacianinas y betaxantinas poseen una estructura general similar, los principales mecanismos de degradación de betaxantinas serían la descarboxilación, isomerización e hidrólisis (Schwartz *et al.*, 2017).

- ✚ **Hidrólisis:** las betaxantinas se hidrolizan, rompiéndose el enlace aldímico entre el ácido betalámico y el grupo amino (Figura 3). Como consecuencia el color amarillo intenso cambia a color amarillo pálido (Herbach *et al.*, 2006). Esta reacción ocurre tanto por efecto de la

temperatura como por condiciones alcalinas y ácidas, extremas (Piattelli *et al.*, 1965; Strack *et al.*, 2003). La hidrólisis de las betaxantinas está acompañada de una regeneración parcial, que se beneficia a pH 4 – 6. El mecanismo propuesto en esta regeneración involucra la condensación de base de Schiff del grupo aldehído del ácido betalámico con el aminoácido nucleofílico (Schwartz *et al.*, 2017).

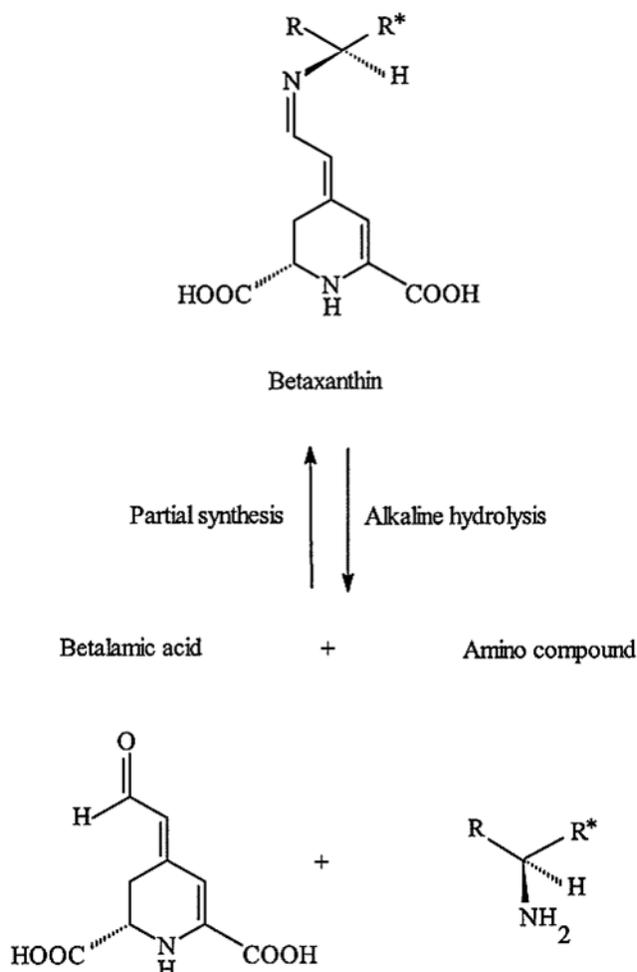


Figura 3. Hidrólisis alcalina y síntesis parcial de betaxantinas. R\*=COOH en aminoácidos y H en aminas, respectivamente (Stintzing *et al.*, 2002).

- + **Descarboxilación:** las betaxantinas podrían sufrir descarboxilación en C11 y C13 (Figura 2c). La descarboxilación produce un desplazamiento hipsocrómico, que puede ser explicado por una disminución en la deslocalización de los electrones  $\pi$  en los compuestos descarboxilados. La ruptura del grupo carboxilo en C13 de la indicaxantina en agua a 100 °C ha sido reportada, resultando en una menor absorción máxima comparada con el pigmento original (Herbach *et al.*, 2006).

- Isomerización:** Bajo condiciones ácidas, alcalinas y en tratamientos térmicos las betaxantinas sufren isomerización, al igual que el ácido betalámico y las betacianinas, la que se considera una modificación estructural más que una reacción de degradación (Herbach *et al.*, 2006). La epimerización en C11 de la indicaxantina fue reportada por Wilcox *et al.* (1965). Considerando la estructura de la indicaxantina, un total de ocho estereoisómeros son teóricamente posibles, de los cuales al menos cuatro han ido observados, con fuerte dependencia del disolvente en la formación de los estereoisómeros preferidos, así como la presencia de estos en equilibrios dinámicos (Stintzing *et al.*, 2006). Los dos estereoisómeros principales de la indicaxantina en solución acuosa se muestran en la Figura 4.

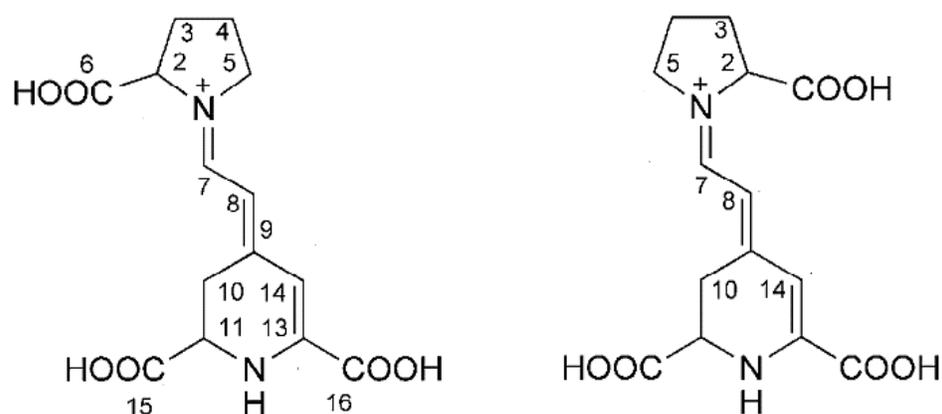


Figura 4. Principales estereoisómeros de la indicaxantina identificados en solución acuosa (Stintzing *et al.*, 2006).

### 1.3.2. Factores que afectan la estabilidad de las betaxantinas

Se ha descrito que la estabilidad de las betaxantinas está influenciada por factores como: temperatura, pH, actividad de agua, luz, oxígeno y presencia de otros compuestos.

- Temperatura:** la degradación térmica constituye el factor más importante en la estabilidad de las betaxantinas, durante el procesamiento y almacenamiento y está fuertemente influenciado por el pH. Un incremento de la temperatura ( $> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o incluso valores cercanos a la temperatura ambiental ( $\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) provocan la hidrólisis del enlace aldimínico y la ruptura de las betaxantinas, disminuyendo la retención de los pigmentos, en función también del tiempo de exposición (Coskuner *et al.*, 2000; Cai *et*

*al.*, 2001); mientras que bajo refrigeración ( $\leq 5$  °C), se observa un leve cambio en el color y la estabilidad (Martins *et al.*, 2017).

- ✚ **pH:** las betaxantinas son solubles en medio acuoso y tienen cierta estabilidad a pH entre 4 y 7, mientras que su mayor estabilidad es a pH = 5,5, cercano al pH de los frutos (Coskuner *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2001; Moßhammer *et al.*, 2005a; Herbach *et al.*, 2006). Bajo condiciones alcalinas y ácidas extremas (Piattelli *et al.*, 1965; Strack *et al.*, 2003), el enlace aldimínico se rompe, produciendo ácido betalámico y el correspondiente amino-compuesto (Stintzing *et al.*, 2002).
- ✚  **$a_w$ :** la mayor estabilidad de las betaxantinas ha sido reportada en alimentos o modelos con baja humedad y actividad de agua, debido a la participación del agua en reacciones de degradación (Cohen y Saguy, 1983; Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2017).
- ✚ **Luz:** la presencia de luz favorece las reacciones de degradación de las betaxantinas, a través de mecanismos de ruptura hidrolítica (Moßhammer *et al.*, 2006a). La degradación de los pigmentos puede incrementarse hasta el doble en presencia de la luz (Gandía-Herrero *et al.*, 2013), ya que la luz excita los electrones  $\pi$  a un estado mayor de energía, conduciendo a una menor energía de activación y consecuentemente a un mayor nivel de reactividad de la molécula (Martins *et al.*, 2017).
- ✚ **Concentración:** el contenido de pigmentos presente en las matrices tiene un efecto determinante en la estabilidad. Una mayor concentración incrementa la estabilidad, por lo que pequeñas cantidades de betaxantinas serían más susceptibles a degradación (Martins *et al.*, 2017). La estabilidad de estos pigmentos también se ve afectada por la relación con otros pigmentos y la relación betaxantina/betacianina (Sáenz *et al.*, 2012).
- ✚ **Oxígeno:** la presencia de oxígeno favorece la degradación de las betaxantinas (Singer y Vonelbe, 1980), aunque tiene un efecto marginal ya que la oxidación no es el principal proceso de degradación de estos pigmentos (Sáenz *et al.*, 2012).
- ✚ **Presencia de otros compuestos:** la presencia de azúcares, ácidos y pectinas en el fruto favorece la estabilidad de las betaxantinas, comparadas con soluciones puras (Moßhammer *et al.*, 2005a; Herbach *et al.*, 2006). De modo similar, la presencia de ácido ascórbico, eritórbico y cítrico favorece la estabilidad de las betaxantinas (Moßhammer *et al.*, 2006a; Moßhammer *et al.*, 2007; El Gharras *et al.*, 2008), atribuido a la eliminación del oxígeno, el cual acelera la degradación de las betalainas (Moßhammer *et al.*, 2007). La presencia de metales como hierro y cobre disminuyen la efectividad del ácido ascórbico como protector de las

betaxantinas, al catalizar la oxidación de este. Los agentes quelantes forman complejos e inducen la degradación de los pigmentos, por lo que el empleo de inhibidores de quelantes (ácido cítrico, EDTA) puede prevenir la degradación inducida por metales (Martins *et al.*, 2017). Compuestos fenólicos como butilhidroxianisol (BHA), quercetina o tocoferol y antioxidantes que contienen azufre como sulfito y metabisulfito de sodio, que inhiben reacciones de autooxidación en cadena por radicales libres, no son efectivos en la estabilización de las betaxantinas, dado que este mecanismo parece no estar involucrado en la degradación de las betalaínas (Schwartz *et al.*, 2017).

#### 1.4. Microencapsulación de betaxantinas

La encapsulación en la industria alimentaria favorece la conservación de compuestos bioactivos y mantiene su calidad por más tiempo al reducir la interacción de los compuestos activos encapsulados ya sea con otros ingredientes del alimento o con las condiciones del medio ambiente (pH, temperatura, oxígeno y humedad). También disminuye la velocidad de transferencia hacia el medio externo; promueve una manipulación más fácil; controla la liberación del activo; enmascara el sabor del activo; y, por último, diluye el activo cuando se debe utilizar en cantidades muy pequeñas (Shahidi y Han, 1993; Gharsallaoui *et al.*, 2007). El incremento en la demanda por alimentos funcionales y suplementos dietéticos ha impulsado el crecimiento del mercado de alimentos encapsulados, proyectándose un crecimiento anual de 7,5%, que alcanzarían los 14,1 billones de dólares para 2025 (MarketsandMarkets, 2020).

La microencapsulación es el proceso mediante el cual el compuesto activo es rodeado por un recubrimiento o pared formando una barrera física contra factores externos perjudiciales y la interacción con otros componentes del producto (Figura 5), permitiendo además, la liberación controlada en un lugar y/o tiempo específico (Sandoval-Aldana *et al.*, 2004; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

El secado por atomización (Figura 6) es la técnica más comúnmente utilizada en la microencapsulación, por su bajo costo y disponibilidad de equipos (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Ravichandran *et al.*, 2014; Vergara *et al.*, 2014; Sáenz *et al.*, 2015; Khan, 2016). Comparado con la liofilización, por ejemplo, el secado por atomización es 30 a 50 veces más barato (Desobry *et al.*, 1997). En el secado por atomización se producen polvos a partir de soluciones o dispersiones líquidas, atomizándolas en forma de pequeñas gotas, en un flujo de gas (aire o nitrógeno) caliente. Debido a la rápida evaporación del solvente (agua u otro) se obtiene un polvo de forma instantánea, encapsulando el compuesto activo en una matriz protectora de naturaleza polimérica (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Domínguez, 2011).

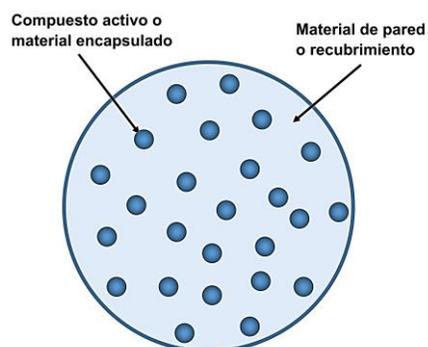
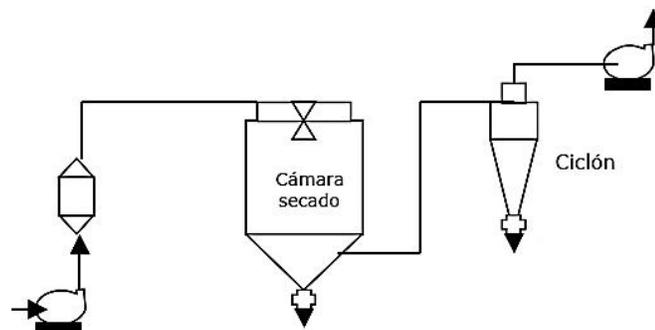
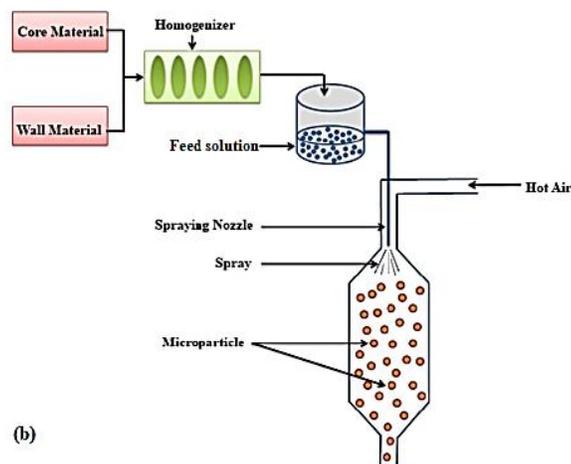


Figura 5. Representación esquemática simplificada de una micropartícula (microesfera) obtenida por secado por atomización.



(a)



(b)

Figura 6. Representación esquemática del diseño típico de un secador por atomización (Sandoval-Aldana *et al.*, 2004) (a) y del proceso de microencapsulación por secado por atomización (Bakry *et al.*, 2016) (b).

En la literatura se han encontrado algunos estudios sobre encapsulación y secado de betaxantinas. Gandía-Herrero *et al.* (2010) encapsularon betaxantinas de frutos de *Opuntia* sp., usando maltodextrina como agente encapsulante y secado por atomización. La temperatura de secado fue la variable independiente a optimizar para incrementar el rendimiento de betaxantinas encapsuladas y la estabilidad posterior durante el almacenamiento. Los autores encontraron un rendimiento de encapsulación de las betaxantinas entre 90% y 93% y retención de los pigmentos de 90% en las micropartículas almacenadas a -20, 4 y 20 °C en ausencia de luz. En un estudio posterior (Gandía-Herrero *et al.*, 2013) los mismos autores reportaron a 20 °C y ausencia de luz una retención entre 60% en micropartículas de miraxantina V, empleando maltodextrina como agente encapsulante; mientras que al emplear quitosano, el pigmento se degradó completamente en un mes (Gandía-Herrero *et al.*, 2013).

Fernández-López *et al.* (2018) encapsularon un extracto rico en betaxantinas de *O. ficus-indica* usando maltodextrina como agente encapsulante, con 71% de eficiencia de encapsulación y 60% de retención de pigmentos en almacenamiento a 20 °C por 6 meses. Betaxantinas de *O. megacantha* se encapsularon con maltodextrina-mucílago (1:0,225), con retención del 60% de los pigmentos almacenados por un mes a 18 °C y 90% de humedad relativa (Otálora *et al.*, 2018).

Moßhammer *et al.* (2006c) encapsularon betaxantinas de tunas anaranjadas *O. ficus-indica* con maltodextrina (ED: 18 – 20) por secado por atomización y liofilización, encontrando una retención de pigmentos de 93% y 96%, respectivamente, en los productos recién elaborados respecto a los jugos iniciales. Sin embargo, los autores no estudiaron la degradación de los pigmentos durante el almacenamiento.

Galdino *et al.* (2016) evaluaron la estabilidad del color amarillo de la pulpa de tuna anaranjada *O. ficus-indica* secada por atomización, utilizando maltodextrina (ED = 10) como *carrier*, durante 40 días a dos temperaturas (25 y 40 °C). Los resultados no mostraron una variación significativa de la luminosidad o el color amarillo de los polvos durante el almacenamiento a ninguna de las temperaturas estudiadas.

En otros estudios las betaxantinas se han encapsulado como compuestos secundarios, junto a las betacianinas (Sáenz *et al.*, 2009; Ruiz-Gutiérrez *et al.*, 2014; Vergara *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2015; Ruiz-Gutiérrez *et al.*, 2017; Zuanon *et al.*, 2019).

## 1.5. Agentes encapsulantes

La selección del agente encapsulante en el secado por atomización resulta muy importante tanto para la eficiencia de encapsulación como para la estabilidad de las micropartículas. El agente encapsulante debe proteger el compuesto activo de los factores que pueden provocar su degradación, evitar su interacción con otros ingredientes, y/o permitir la liberación controlada en condiciones deseadas (Shahidi y Han, 1993). Los criterios de selección de agentes encapsulantes están basados principalmente en sus características fisicoquímicas como solubilidad, peso molecular, capacidad de formación de películas o propiedades emulsificantes, además de los costos asociados (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

### 1.5.1. Maltodextrina

Los almidones hidrolizados como la maltodextrina son solubles en agua y permiten una alta concentración de sólidos a una baja viscosidad. La maltodextrina se forma al hidrolizar parcialmente la harina de maíz o trigo, generalmente, por acción enzimática y/o ácida, y se comercializan según sus equivalentes de dextrosa (grado de hidrólisis ED: 3 – 20) (Kennedy *et al.*, 1995; Clarke, 2003; Freers, 2009; Labuschagne, 2018). Son oligosacáridos con cadenas lineales ( $n$ ) entre 3 y 20 moléculas de D-glucosa, unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 glicosídico (Figura 7) y un peso molecular que se encuentra entre  $5,04 \times 10^2 \text{ g mol}^{-1}$  ( $n = 3$ ) y  $2,77 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  ( $n = 17$ ). Su composición está influenciada por las condiciones de obtención empleadas (pretratamientos, temperatura, tiempo de hidrólisis, tipo y concentración de las enzimas), por lo que maltodextrinas con un mismo valor de ED, podrían tener diferentes propiedades (Dokic *et al.*, 1998; Freers, 2009; Carareto *et al.*, 2010; A.C.S., 2018).

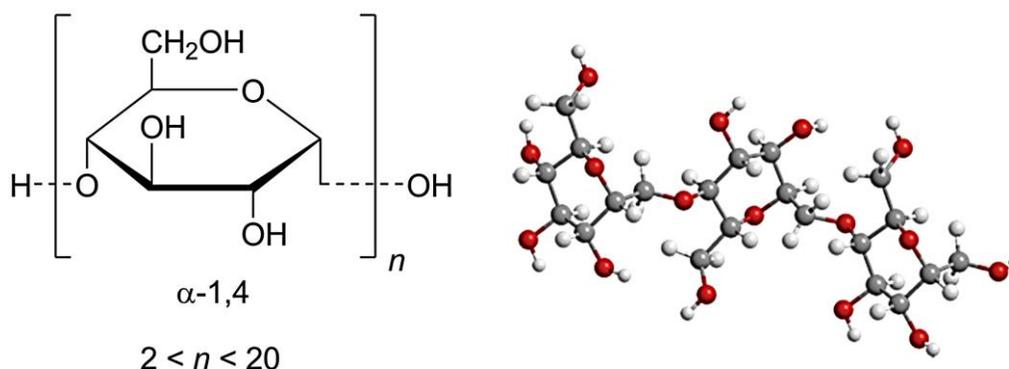


Figura 7. Representación esquemática bidimensional y tridimensional de la estructura de la maltodextrina (A.C.S., 2018).

Las maltodextrinas son un intermedio entre los almidones y los jarabes de glucosa ( $ED > 20$ ) (Kennedy *et al.*, 1995; Clarke, 2003; Day, 2009); contrariamente al almidón son solubles en agua fría. Las MD son usadas como aditivos alimentarios en variedad de productos, desde fórmulas infantiles hasta helados o cerveza, además de ser un ingrediente suplementario en endulzantes como sucralosa o estevia (Dokic *et al.*, 1998; A.C.S., 2018).

Actualmente, la maltodextrina es el agente encapsulante más empleado en los trabajos referidos a encapsulación de betaxantinas (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013; Galdino *et al.*, 2016; Fernández-López *et al.*, 2018; Otálora *et al.*, 2018). Gandía-Herrero y García-Carmona (2013) utilizaron también quitosano como agente encapsulante, con una mayor pérdida de betaxantinas comparado con el empleo de maltodextrina.

En trabajos centrados en encapsulación de betacianinas como pigmentos principales, ya sea en tuna púrpura o betarraga, donde las betaxantinas aparecen como componentes minoritarios, se ha empleado también maltodextrina, además de inulina y aislado de proteína de soya (Sáenz *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2015), goma arábiga, goma guar, pectina y goma xantana (Ravichandran *et al.*, 2014), almidón modificado (Vergara *et al.*, 2014; Sáenz *et al.*, 2015) y mucílago de nopal (Otálora *et al.*, 2015), con resultados variables, respecto a la maltodextrina, fundamentalmente al emplear mezclas de agentes encapsulantes.

### 1.5.2. Mucílago de nopal

El mucílago de nopal es un carbohidrato complejo, presente en los frutos y las paletas de esta planta (Medina-Torres *et al.*, 2000; Espinoza, 2002). Tiene un peso molecular entre  $2,3 \times 10^4$  a  $4,3 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup> (Trachtenberg y Mayer, 1981; Medina-Torres *et al.*, 2000). Presenta una fracción polisacárida de alto peso molecular y cantidades variables de ácido galacturónico, ácido gulurónico, glucosa, xilosa, galactosa, ramnosa y arabinosa (Sáenz *et al.*, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2007). La estructura propuesta (Figura 8) ha sido descrita como una molécula de cadena lineal con unidades de (1-4) ácido  $\alpha$ -D-galacturónico y (1-2)  $\beta$ -L-ramnosa unidas a cadenas laterales de (1-6)- $\alpha$ -D-galactosa con residuos de O-4 ramnosa. La composición de las cadenas periféricas es compleja; identificándose por lo menos 20 tipos diferentes de oligosacáridos (la mayoría de ellos disacáridos y trisacáridos) (McGarvie y Parolis, 1981a, b).

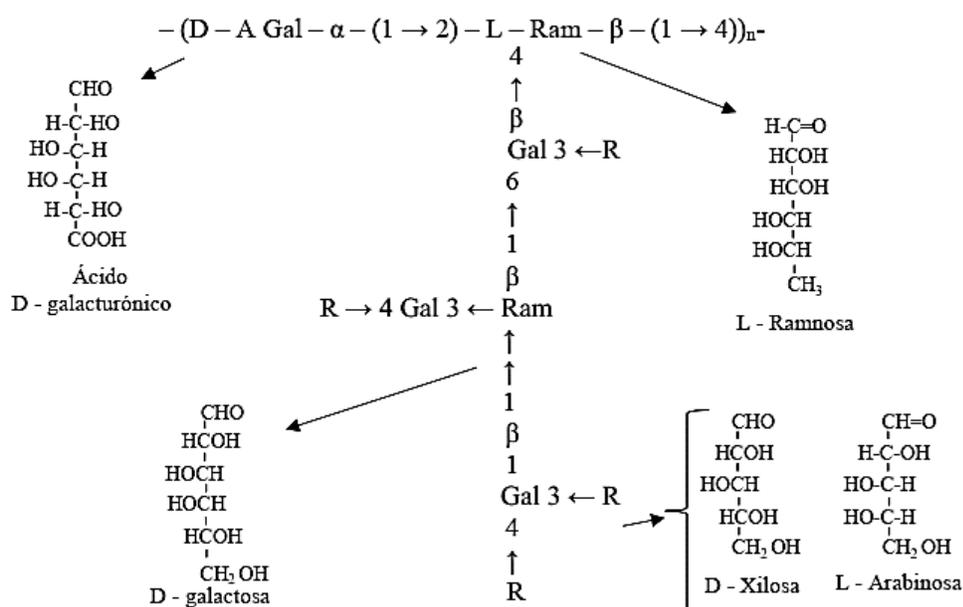


Figura 8. Representación esquemática de la estructura parcial del mucílago de las paletas de nopal (McGarvie y Parolis, 1981b).

El rendimiento durante la extracción del mucílago varía entre 0,61% – 1,5% (Sepúlveda *et al.*, 2007; León-Martínez *et al.*, 2010; Otálora *et al.*, 2015). Las diferencias se han atribuido al método de extracción, la edad de las paletas y las condiciones climáticas, que inducen la síntesis de mucílago en época de sequía (Sáenz *et al.*, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2007).

Sin embargo, el mucílago es propenso a un rápido deterioro microbiológico, debido a su alto contenido de agua, limitando su manejo, por lo que la aplicación de otros procesos, como el secado por atomización, favorecen el almacenamiento y extienden su vida útil (Contreras-Padilla *et al.*, 2012), aunque las propiedades fisicoquímicas y funcionales se pueden alterar significativamente (Wang *et al.*, 2010). El rendimiento durante el proceso de secado por atomización se incrementa con la disminución de la temperatura de entrada al secador o el flujo de alimentación, así como con el aumento de la velocidad de atomización. Mientras que la humedad se reduce con el aumento de la temperatura de entrada al secador, la velocidad de atomización o con la disminución del flujo de alimentación (León-Martínez *et al.*, 2010). Por otra parte, la viscosidad del mucílago disminuye con el incremento de la temperatura de entrada al secador o la velocidad de atomización, así como con la reducción de la velocidad de alimentación (León-Martínez *et al.*, 2011).

Los trabajos con mucílago de nopal como agente encapsulante son escasos; se ha empleado mucílago extraído de forma acuosa a 20 °C, precipitado con alcohol y secado en horno de convección de aire forzado a 105 °C, en la encapsulación

de betalaínas de tuna púrpura *O. ficus-indica* (Otálora *et al.*, 2015) y liofilizado, en la encapsulación de betaxantinas de tuna anaranjada *O. megacantha* (Otálora *et al.*, 2018). Sin embargo, durante la precipitación y secado del mucílago algunas propiedades, principalmente la solubilidad, se ven afectadas. Algunos autores han propuesto el empleo de mucílago extraído de forma acuosa a temperatura ambiente (~ 25 °C), sin precipitar o secar previamente, como material de encapsulación de huevo y ácido gálico (Medina-Torres *et al.*, 2013; Medina-Torres *et al.*, 2017). Hasta este momento, se ha encontrado solo un estudio que ha empleado mucílago extraído de forma acuosa a 70 °C, sin secar o precipitar, como agente encapsulante de betalaínas de la pulpa y la piel de pitaya roja (*Escontria chiotilla* y *Stenocereus queretaroensis*), con relación 15:1 y 7:1 (betalaínas: mucílago) y un 68,8% de pérdida de pigmentos durante el secado (Soto-Castro *et al.*, 2019).

Además, es importante mencionar que sin bien las paletas jóvenes (nopalitos) son consumidas como vegetales, en México principalmente, las paletas más grandes no tienen valor comercial y representan una pérdida para los agricultores y un incremento en la generación de residuos (Contreras-Padilla *et al.*, 2012). El uso del mucílago de estas paletas como agente encapsulante de betalaínas de tuna, va en la línea actual de la economía circular, que busca disminuir la generación de residuos y fomentar su reutilización y valoración (MMA, 2020). Las paletas de nopal son especialmente importantes en el desarrollo de zonas áridas y semiáridas, en el actual contexto de calentamiento global y agotamiento de los recursos naturales, donde la voluntad de generar beneficios sostenibles y competitivos determina la necesidad de un cambio de pensamiento lineal (producir, consumir, eliminar) hacia un enfoque circular cerrando los ciclos de uso de los materiales (Suzanne *et al.*, 2020). En este contexto, en este trabajo se utilizará mucílago extraído de paletas de nopal como agente encapsulante, comparado con maltodextrina y mezcla de mucílago de nopal con maltodextrina.

## 1.6. Aplicación de betaxantinas en alimentos

Los estudios centrados en el uso de betaxantinas como colorantes en alimentos son escasos y recientes. Rodríguez-Sánchez *et al.* (2017) evaluaron la retención de betaxantinas de pitayas amarillas (*Stenocereus pruinosus*) y los parámetros de color durante el almacenamiento de gomitas y bebidas refrescantes preparadas con jugo y/o pulpa. Los resultados mostraron que las betaxantinas fueron más estables en la oscuridad y a bajas temperaturas. Además, las betaxantinas fueron más estables en las gomitas respecto a las bebidas refrescantes, lo cual se debería a la diferencia de actividad de agua entre estos productos, lo que se vio reflejado en el cambio del color durante el almacenamiento, siendo significativamente menor en las gomitas que en las bebidas.

Fernández-López *et al.* (2018) aplicaron micropartículas preparadas con extractos ricos en indicaxantina de frutos de *O. ficus-indica* como colorantes de yogur y bebidas refrescantes. Los autores reportaron una mayor estabilidad de los pigmentos y el color en el yogur, con una retención de indicaxantina en oscuridad del 95% a los 28 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C). Mientras que en las bebidas la retención fue de 90% en iguales condiciones. Los alimentos expuestos a la luz mostraron una retención de 40% y 50% en yogur y bebida, respectivamente.

En otro estudio se analizaron dos ingredientes colorantes de tunas amarillo-anaranjadas (*Opuntia ficus-indica*), obtenidos por concentración y liofilización, que fueron aplicados en una bebida modelo. Las betaxantinas se degradaron durante el almacenamiento en refrigeración de las bebidas. Sin embargo, los colorantes almacenados a temperatura ambiente resultaron estables (Carmona *et al.*, 2019). Betaxantinas de *Opuntia megacantha* encapsuladas por secado por atomización y gelificación iónica fueron aplicadas como colorante en yogur y gomitas. La variación del color fue menor a 5 al final de los 30 días de almacenamiento a 4°C, mostrando la estabilidad de los pigmentos en los alimentos (Otálora *et al.*, 2017; Otálora *et al.*, 2019).

Estudios en fuentes de betacianinas, donde las betaxantinas fueron minoritarias, han empleado micropartículas como colorantes de bebidas refrescantes y yogures. Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2017) aplicaron micropartículas de jugo clarificado de tuna roja como colorante de cereales extruidos, con incremento de características de los cereales como color o capacidad antioxidante y buena aceptación sensorial. Vargas-Campos *et al.* (2018) emplearon micropartículas de *Stenocereus pruinosus* encapsuladas con almidón de papa, comercial y modificado, como colorante de yogur almacenado a 4 °C durante 32 días, con cambios en los parámetros de color L\* (2,8 – 3,0), C\* (2,2 – 2,6) y h° (4,3 – 6,3) durante los primeros 8 días, permaneciendo constante después de los 8 días de almacenamiento.

Micropartículas de pulpa y extracto ultrafiltrado de tuna púrpura aplicadas como colorante a yogur almacenados a 4°C durante 10 semanas mostraron variación de los parámetros de color, con una retención de betaxantinas (> 50%) mayor a la de betacianinas. Además, el yogur con micropartículas de pulpa fue más estable, atribuido a la presencia del mucílago, el cual estuvo ausente en el extracto ultrafiltrado (Alfaro, 2013). Resultados similares se obtuvieron al aplicar estas micropartículas en bebidas refrescantes almacenadas a 4°C, durante 30 días. Las constantes de degradación de las betaxantinas fueron significativamente menores que las de betacianinas, corroborando que los polímeros empleados como agentes encapsulantes mejoraron la estabilidad de las betalaínas. Por su parte, la variación de color ( $\Delta E^*$ ) en las bebidas estuvo entre 30 y 53 en dicho período de almacenamiento (Sáenz *et al.*, 2015).

## 1.7. Hipótesis

La encapsulación de la pulpa del fruto anaranjado de tuna con el mucílago de la paleta de nopal (*Opuntia ficus-indica*) por secado por atomización presentará similar eficiencia de encapsulación y estabilidad de betaxantinas respecto al uso de maltodextrina.

Además, la aplicación de las micropartículas en alimentos (bebida refrescante y yogur) tendrá una estabilidad similar de color respecto a los colorantes sintéticos y naturales.

## 1.8. Objetivos

### 1.8.1. Objetivo general

Obtener, caracterizar y aplicar micropartículas de la pulpa del fruto anaranjado con el mucílago de la paleta de nopal (*Opuntia ficus-indica*) por secado por atomización para su uso como colorante alimentario.

### 1.8.2. Objetivos específicos

- I. Caracterizar física y químicamente la pulpa del fruto de tuna anaranjada y el mucílago extraído de la paleta (nopales) de la misma cactácea (*Opuntia ficus-indica*).
- II. Determinar mediante superficie respuesta (MSR) las condiciones óptimas de microencapsulación (temperatura de entrada al secador y relación pulpa/ agente encapsulante) de la pulpa de tuna anaranjada, empleando mucílago de nopal (M), maltodextrina (MD) y una mezcla mucílago-maltodextrina (1:1) (M+MD), como agentes encapsulantes.
- III. Caracterizar física y químicamente las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas.
- IV. Estudiar la estabilidad de la indicaxantina y el color de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, almacenadas a 5, 37 y 60 °C.
- V. Evaluar la estabilidad de la indicaxantina y el color en alimentos (yogur y bebida refrescante) con incorporación de las micropartículas, de mejores características y estabilidad, en almacenamiento a 5 °C.
- VI. Comparar la estabilidad del color aportado por las micropartículas, con el color aportado por colorantes comerciales, durante el almacenamiento refrigerado de los alimentos modelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

Los frutos de tuna anaranjada y las paletas de *O. ficus-indica* fueron recolectados en marzo de 2017 desde la plantación en la estación experimental Antumapu ubicada en la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile (30° 40´ S, 70° 38´ O). La maltodextrina 15 – 20 ED (MD) fue adquirida en Prinal (Santiago, Chile). Los alimentos empleados como patrón de color (yogur de vainilla coloreado con una mezcla de los colorantes naturales Annato (E160b) y cúrcuma (E100ii) y bebida refrescante tipo agua saborizada de pera coloreada con una mezcla de los colorantes sintéticos tartrazina (E102) y amarillo crepúsculo (E110)) fueron adquiridos del mercado local.

### 2.2. Obtención y caracterización de la pulpa

Las frutas en estado de madurez se lavaron, pelaron y despulparon en una prensa tornillo (tamiz de 2 mm). La pulpa de tuna (P) se almacenó a -20 °C en bolsas de polietileno hasta su posterior uso. A la pulpa se le realizaron los siguientes análisis:

- ✚ **Humedad, actividad de agua ( $a_w$ ), pH y acidez:** se determinaron según los métodos descritos en AOAC (1990).
- ✚ **Contenido de sólidos solubles (°Brix):** se midió usando un refractómetro digital (Boeco, BOE 32195, Hamburgo, Alemania).
- ✚ **Contenido de polifenoles totales:** se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Rayleigh Analytical Instruments Corp., UV-9200, Beijing, China) (Anexo II).
- ✚ **Contenido de azúcares totales:** se determinó por el método de Antrona (Osborne y Voogt, 1978) usando un espectrofotómetro UV-Vis (Rayleigh Analytical Instruments Corp., UV-9200, Beijing, China) (Anexo III).

- ✚ **Capacidad antioxidante:** se determinó por el método de la Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) (Dávalos *et al.*, 2004), usando un fluorímetro (Flx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos), acoplado al software Gen5 (Anexo IV).
- ✚ **Parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$ ):** se determinaron usando un espectrofotómetro-colorímetro (UltraScan Pro, Hunter Lab, Reston, VA, Estados Unidos), acoplado al software Easy Match QC. Se empleó el ángulo estándar de observación de  $10^\circ$  y el estándar de iluminación D65, correspondiente a luz natural de día.
- ✚ **Identificación y cuantificación de betalaínas:** se realizó por HPLC de acuerdo con el método de Fernández-López y Almela (2001) usando un cromatógrafo líquido (Agilent, 1100-1200 series) equipado con una bomba cuaternaria (G1311A), columna con termostato (G1316A), desgasificador (G1379A) y detector de arreglo de diodos (G1315B), acoplado al software ChemStation para LC 3D (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Las condiciones de trabajo fueron: columna C18 ( $4\ \mu\text{m}$  de tamaño de partícula x 30 cm x 3,9 mm diámetro interno, Nova-Pack, Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos) y gradiente de elución lineal de 30 minutos, desde 100% de solvente A (1% de ácido acético en agua) hasta 12% de solvente B (1% de ácido acético en acetonitrilo), flujo de  $1\ \text{mL min}^{-1}$  y volumen de inyección de  $20\ \mu\text{L}$ . La indicaxantina fue detectada a 484 nm y la betanina a 535 nm.
  - *Preparación de estándares de betalaínas:* la indicaxantina y la betanina se aislaron de la pulpa en una columna abierta con gel de sílice ( $0,063 - 0,200\ \text{mm}$  de poro,  $70 - 230$  de malla ASTM, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La curva de calibración para indicaxantina ( $1,4 - 75,6\ \text{mg L}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,9945$ ) y betanina ( $3,9 - 45,4\ \text{mg L}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,977$ ), fue desarrollada graficando el área de HPLC de los pigmentos puros vs. la concentración espectrofotométrica según Stintzing *et al.* (2005) (Anexo V).

### 2.3. Obtención y caracterización del mucílago de nopal

El mucílago (M) se extrajo de paletas entre 0 – 2 años siguiendo una técnica optimizada anteriormente por García (2017), que consistió en cortar las paletas en cubos de 0,5 cm de grosor después de remover la piel (espinas, epidermis y clorénquima), dejando solamente el tejido parénquima. Las paletas se mezclaron con agua en relación 7:1, se trituraron en una batidora de mano (Koninklijke Philips N.V., Pure Essentials Collection HR1372/90, Amsterdam, Holanda) y se sometieron durante 3 horas a  $90^\circ\text{C}$ , con agitación constante. Posteriormente, la

solución fue filtrada a través de una gasa fina y por papel de filtro Whatman™, grado 1 (GE Healthcare Life Sciences-Latin America, Sao Paulo, Brasil) y centrifugada a 4850 rpm durante 10 minutos (Hettich Zentrifugen, Universal 320 R, Tuttlingen, Alemania). El sobrenadante se preservó a  $5 \pm 2$  °C hasta su posterior caracterización y empleo.

El mucílago (M) extraído de las paletas se secó en un mini secador por atomización (Büchi Labortechnik A.G., B-290, Flawil, Suiza). La temperatura de entrada al secador fue 166 °C y la concentración de sólidos solubles del mucílago de 4 °Brix. El mucílago seco (MS) se almacenó a -20 °C para su posterior dispersión como mucílago dispersado (MR) y/o análisis. A los mucílagos (M, MS y MR) se les realizaron los siguientes análisis, según correspondió:

- ✚ **Humedad, actividad de agua, pH, acidez, contenido de sólidos solubles, polifenoles totales, capacidad antioxidante y parámetros de color:** se determinaron según lo descrito anteriormente en la pulpa.
- ✚ **Solubilidad:** se determinó según el método de Cano-Chauca *et al.* (2005). MS (1 g) se adicionó a 100 mL de agua destilada, se agitó durante 5 min y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Se tomaron 25 mL del sobrenadante y se transfirió a placas de vidrio secadas y taradas. Las placas se colocaron en estufa durante 24 horas a 105 °C. El porcentaje de solubilidad se calculó por diferencia de peso.
- ✚ **Higroscopicidad:** se determinó de acuerdo al método descrito por Cai y Corke (2000). MS (1 g) se colocó en un vidrio reloj previamente secado y tarado que se colocó en un desecador hermético con solución saturada de NaCl a 25 °C por 7 días. La higroscopicidad se expresó como g de humedad por 100 g de muestra ( $\text{g H}_2\text{O } 100 \text{ g}^{-1}$ ).
- ✚ **Capacidad de hinchamiento:** se determinó según el método de Femenia *et al.* (1997). La muestra (0,5 – 1,0 g) se colocó en un tubo cónico graduado al que se le añadieron 10 mL de agua destilada, se dejó en reposo durante 16 h y se registró el volumen de gel hinchado. La capacidad de hinchamiento se expresó como  $\text{mL g}^{-1}$  de muestra seca.
- ✚ **Cambio de color ( $\Delta E^*$ ):** se calculó entre M y MR a partir de la ecuación (1), donde  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  y  $b_0^*$  fueron los parámetros de color de M y  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  fueron los valores de MR.

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2} \quad (1)$$

## 2.4. Optimización de la encapsulación de la pulpa de tuna

La pulpa de tuna anaranjada (P) se encapsuló mediante secado por atomización utilizando maltodextrina (MD), mucílago de nopal (M) y una mezcla mucílago-maltodextrina (1:1) (M+MD) como agentes encapsulantes (AE). Se aplicó un Diseño Compuesto Central (DCC) más punto axial centrado en la cara ( $\alpha = 1$ ) con 12 corridas: 4 puntos experimentales, 4 puntos centrados en la cara y 4 puntos centrales. La temperatura del aire de entrada al secador (T) y la relación pulpa/agente encapsulante (P/AE) fueron las variables independientes. La eficiencia de encapsulación de indicaxantina (EE) y el rendimiento del proceso (R) fueron las variables dependientes.

Se aplicó la metodología de superficie respuesta (MSR) para optimizar las variables independientes. En la construcción de los modelos se consideraron los efectos significativos lineales y cuadráticos de T y de la relación P/AE, así como la interacción entre T y P/AE. Los efectos lineales se consideraron para todos los modelos, incluso cuando no fueron significativos, porque el efecto lineal fue la base del experimento. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión de segundo orden, según la ecuación (2), donde Y fue la respuesta, los subíndices  $i$  y  $j$  oscilaron entre 1 y el número de variables independientes ( $n = 2$ );  $\beta_0$  fue el término de intersección; los valores de  $\beta_i$  fueron los coeficientes lineales; los valores  $\beta_{ii}$  fueron los coeficientes cuadráticos; los valores de  $\beta_{ij}$  fueron los coeficientes de la interacción.  $X_i$  y  $X_j$  fueron los niveles de las variables independientes. Para la optimización se empleó la función Deseabilidad (D), maximizando las dos variables respuesta. La función D permite asignar un valor entre 0 y 1 a un set de respuestas, donde 0 corresponde al mínimo de una variable y 1 al máximo (Almeida *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013). En este caso, el valor 1 indicó un 100% de EE y R.

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

### 2.4.1. Preparación de las micropartículas

En la Tabla 1 se muestran las variables independientes y los niveles del diseño experimental utilizado en la encapsulación de la pulpa de tuna con maltodextrina, con mucílago y con la mezcla mucílago-maltodextrina (P-MD, P-M y P-M+MD).

En el sistema P-MD las micropartículas se prepararon como sigue: P (30 g) se mezcló según el diseño con MD (6 – 30 g) y agua hasta completar 100 g, con agitación constante. La solución se homogeneizó a 26000 rpm por 3 min en un homogeneizador (Kinematica A.G., Polytron PT 21000, Lucerna, Suiza) y se

alimentó con agitación magnética constante a un mini secador por atomización (Büchi Labortechnik A.G., B-290, Flawil, Suiza). Las temperaturas del aire de entrada al secador se mantuvieron según el diseño experimental (110 – 180 °C). El flujo de aire fue 600 L h<sup>-1</sup>, la velocidad de alimentación de 3 mL min<sup>-1</sup> (5%) y la presión de atomización fue de 5 bar. El polvo obtenido se almacenó en oscuridad a -20 °C para los análisis posteriores.

Tabla 1. Variables independientes y niveles del diseño compuesto central más punto axial para la encapsulación en los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD

Variables independientes	Agente encapsulante	Niveles		
		-1	0	+1
Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	X <sub>1</sub>	110	145	180
	MD	1:1	3:1	5:1
Relación pulpa/ agente encapsulante (P/AE)	X <sub>2</sub> M	3:1	4:1	5:1
	M+MD	3:1	4:1	5:1

MD: maltodextrina, M: mucílago.

En el sistema P-M las micropartículas se prepararon mezclando P (30 g) con M (70 g) a distintas concentraciones (14,3 – 8,6 °Brix) de forma que se alcanzaran las relaciones P/AE del diseño experimental (3:1 – 5:1), con agitación constante. Luego se homogenizó y se alimentó al secador como en el sistema P-MD. En el sistema P-M+MD las micropartículas se prepararon mezclando P (30 g) con MD (3 – 5 g) y M (67 – 65 g) a distintas concentraciones (7,7 – 4,5 °Brix) de forma que se alcanzaran las relaciones P/AE del diseño experimental (3:1 – 5:1), con agitación constante. Luego se homogenizó y se alimentó al secador como en el sistema P-MD.

#### 2.4.2. Determinación de las variables respuesta

El contenido de indicaxantina superficial y total se determinó usando el método de Vergara *et al.* (2014) y se cuantificaron por HPLC (Fernández-López y Almela, 2001).

- ✚ **Indicaxantina superficial:** se determinó dispersando 100 mg de micropartículas en 1 mL de solución etanol-metanol (1:1), se agitó por 1 min, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min (Hermle Labortechnik GmbH, Z 326 K, Wehingen, Alemania), se filtró a través de filtro de jeringa 0,22 µm y se inyectó al equipo de HPLC, en las condiciones descritas en 2.2.

- ✚ **Indicaxantina total:** 100 mg de micropartículas se dispersaron en 1 mL de metanol-ácido acético-agua (50:8:42) agitando en un mezclador de vórtex (DLAB Scientific Co., Ltd., MX-S, Beijing, China) durante 1 min. La solución se dejó en baño de ultrasonido por 20 min (Elma Schmidbauer GmbH, Elmasonic S10H, Singen, Alemania), se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se filtró a través de filtro de jeringa 0,22  $\mu\text{m}$  y se inyectó al equipo de HPLC, en las condiciones descritas en 2.2.
- ✚ **EE y R:** se calcularon de acuerdo con las ecuaciones (3) y (4), respectivamente, donde IT representa la indicaxantina total e IS representa la indicaxantina superficial.

$$EE (\%) = ((IT (\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}) - IS (\text{mg } 100 \text{ g}^{-1})) / IT (\text{mg } 100 \text{ g}^{-1})) \times 100 \quad (3)$$

$$R (\%) = (\text{polvo obtenido (g)} / \text{sólidos en la alimentación (g)}) \times 100 \quad (4)$$

## 2.5. Caracterización de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas

A las micropartículas de pulpa de tuna encapsuladas en condiciones óptimas de temperatura y relación P/AE se les determinó la humedad, actividad de agua ( $a_w$ ), contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante, color, indicaxantina superficial y total, higroscopicidad y solubilidad, siguiendo las metodologías descritas anteriormente.

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de las micropartículas se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando un calorímetro DSC 6000 acoplado al software Pyris 11 (PerkinElmer, Waltham, MA, Estados Unidos). Las muestras (0,008 g) se calentaron desde 10 hasta 150  $^{\circ}\text{C}$  en cápsulas de aluminio cerradas con una velocidad de calentamiento de 2  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Una cápsula de aluminio vacía se empleó como control.

## 2.6. Estabilidad de las micropartículas en almacenamiento

Las micropartículas de los tres sistemas (P-MD, P-M y P-M+MD), obtenidas en condiciones óptimas de temperatura y relación P/AE, se almacenaron en ausencia de luz en refrigeración a  $5 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  y en estufa de aire forzado a  $37 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  (Memmert ULM 400, Alemania) y a  $60 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  (Heraeus Hanau, Alemania). Se tomaron muestras por duplicado a distintos tiempos para determinar la variación de los parámetros de color y de contenido de indicaxantina. El cambio de color se calculó según la ecuación descrita anteriormente (1), donde  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  y  $b_0^*$

fueron los parámetros de color en el tiempo inicial de almacenamiento y  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  fueron los valores en cada tiempo evaluado.

El cambio en el índice de pardeamiento (IP) de las micropartículas durante el almacenamiento se calculó a partir de las ecuaciones (5) y (6), empleando los valores de los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  al inicio y al final del almacenamiento.

$$x = (a^* + 1,75 \times L^*) / (5,645 \times L^* + a^* - 3,012 \times b^*) \quad (5)$$

$$IP = 100 \times (x - 0,31) / 0,172 \quad (6)$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (7)$$

En las temperatura donde la retención de indicaxantina de los tres sistemas estuvo bajo el 50% al final del almacenamiento, se determinó la constante de velocidad de degradación de indicaxantina, a partir de la pendiente de la gráfica del logaritmo natural de porcentaje de retención de indicaxantina vs. el tiempo de almacenamiento, ajustado a una ecuación de primer orden, ecuación (7), donde  $C_0$  es la retención inicial de indicaxantina,  $C$  es la retención de indicaxantina en el tiempo  $t$ ,  $k$  es la constante de velocidad de degradación y  $t$  el tiempo de almacenamiento.

## 2.7. Estabilidad del color y los pigmentos en modelos de alimentos

A partir de los resultados obtenidos de las mejores características de las micropartículas (EE, rendimiento, higroscopicidad, humedad) y una menor degradación de indicaxantina durante el almacenamiento, se seleccionaron los sistemas P-MD y P-M+MD, para su aplicación como un ingrediente colorante en dos modelos de alimentos, un yogur natural sin azúcar (adquirido del comercio local) y una bebida refrescante (preparada en el laboratorio).

Para determinar la cantidad de micropartículas a adicionar en cada modelo alimentario, se utilizaron productos del mercado:

- ✚ **Yogur de vainilla (Y-Comercial):** coloreado con una mezcla de colorantes naturales annato (E160b) y cúrcuma (E100ii).
- ✚ **Agua saborizada de pera (B-Comercial):** coloreado con una mezcla de los colorantes sintéticos tartrazina (E102) y amarillo crepúsculo (E110).

A ambos productos comerciales se les determinaron los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). La cantidad de micropartículas a utilizar como agentes colorantes correspondió a un  $\Delta E^* < 5$  entre el color de los alimentos preparados en el

laboratorio y los productos comerciales. En el yogur se agregaron 0,5 g 100 g<sup>-1</sup> y en la bebida 0,3 g 100 mL<sup>-1</sup>.

La bebida refrescante se preparó según la formulación descrita por Obón *et al.* (2009) (Tabla 2). El yogur (Y) y bebida refrescante (B) con la adición de las micropartículas (Y-P-MD, Y-P-M+MD, B-P-MD y B-P-M+MD) se almacenaron en refrigeración ( $5 \pm 2$  °C) durante 28 días. Los parámetros de color, la retención de indicaxantina y el cambio de color se determinaron según lo anteriormente descrito.

Tabla 2. Formulación de la bebida refrescante con micropartículas de P-MD y P-M+MD como colorantes

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentración (g 100 mL<sup>-1</sup>)</b>
Azúcar	8,6
Benzoato de Sodio	0,014
Sorbato de Potasio	0,018
Ácido ascórbico	0,002
Ácido cítrico	0,152
Micropartículas	0,3
Agua	90,72

Los controles comerciales de yogur de vainilla (Y-Comercial) y el agua saborizada (B-Comercial) seleccionados como referencia de color se almacenaron en refrigeración, de igual forma, para determinar la evolución del color durante el período y compararlo con las matrices modelo de alimentos. En los alimentos donde la retención de indicaxantina estuvo bajo el 50% durante el período de almacenamiento, se determinó la constante de velocidad de degradación de indicaxantina, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

## 2.8. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Las condiciones óptimas de encapsulación se determinaron mediante metodología de superficie respuesta, usando el programa Design Expert 12 (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN, Estados Unidos). Los análisis estadísticos de las características de las micropartículas se realizaron empleando el software InfoStat versión 2020 (Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para determinar las constantes de degradación de indicaxantina se empleó una regresión lineal. Para determinar diferencias significativas en las características entre los mucílago y

entre las constantes de degradación se empleó la prueba t-student. Para determinar diferencias significativas en las características físicas, químicas y de color entre los sistemas de micropartículas obtenida en condiciones óptimas, durante el almacenamiento y en los modelos de alimentos, se aplicó análisis de varianza simple (ANDEVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey con una significancia de 0,05. La normalidad de los datos se comprobó con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado y la homogeneidad de varianza se comprobó mediante la Prueba F para igualdad de varianzas (Balzarini *et al.*, 2008).

Los gráficos de retención de indicaxantina, cambio total de color ( $\Delta E^*$ ) y variación en los parámetros  $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$  durante el almacenamiento de las micropartículas y los alimentos, se desarrollaron usando el programa Matlab R2019b (MathWorks, Inc., Natick, MA Estados Unidos).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Características físicas y químicas de la pulpa de tuna anaranjada (*Opuntia ficus-indica*)

La Tabla 3 muestra las características físicas y químicas de la pulpa de los frutos de tuna anaranjada (P) (*Opuntia ficus-indica*). Los resultados fueron similares a reportes previos de humedad (85,1% y 86,6%), sólidos solubles (13,9 y 14,8 °Brix), azúcares totales (14,8%), acidez (0,022% y 0,043% ácido cítrico) y pH (6,1 y 6,6) en frutos de *O. ficus-indica* amarillos y anaranjados (Sáenz y Sepúlveda, 2001b; Fernández-López *et al.*, 2018).

Tabla 3. Características químicas y físicas de la pulpa de tuna anaranjada

Parámetro	Pulpa de tuna anaranjada <sup>†</sup>
Humedad (%)	85,6 ± 0,04
Actividad de agua (a <sub>w</sub> )	0,98 ± 0,01
Sólidos solubles totales (°Brix)	14,1 ± 0,2
Azúcares totales (% glucosa)	13,0 ± 0,2
Acidez (% ácido cítrico)	0,04 ± 0,001
pH	6,2 ± 0,01
Fenoles totales (mg EAG L <sup>-1</sup> )	683,4 ± 18,4
ORAC (mmol ET kg <sup>-1</sup> )	12,2 ± 1,8
Indicaxantina (mg EI 100 g <sup>-1</sup> )	8,0 ± 0,3
Betanina (mg EB 100 g <sup>-1</sup> )	0,5 ± 0,1
L* (luminosidad)	31,3 ± 0,6
C* (croma)	62,6 ± 1,6
h° (tono)	57,6 ± 1,2

EI: equivalente a indicaxantina, EB: equivalente a betanina, EAG: equivalente a ácido Gálico, ET: equivalente a Trolox, †: medias de tres réplicas ± desviación estándar.

En la Figura 9 se puede observar un corte longitudinal y la pulpa con la que se trabajó.

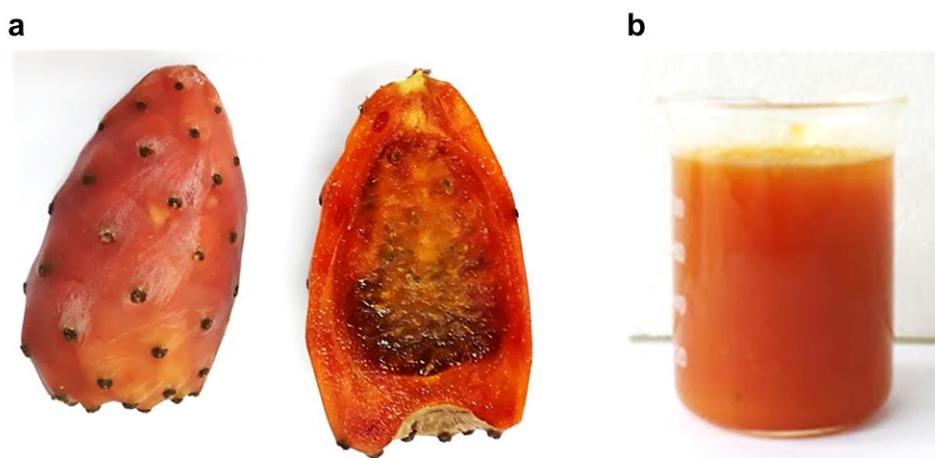


Figura 9. Apariencia externa y corte longitudinal del fruto (a) y pulpa extraída (b) de la tuna anaranjada.

La indicaxantina (pico 1) y la betanina (pico 2) en la Figura 10 fueron identificadas en la pulpa por HPLC. Adicionalmente, la indicaxantina fue la principal betalaína (8,0 mg EI 100 g<sup>-1</sup>), con un contenido igual a resultados previos (Butera *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2009).

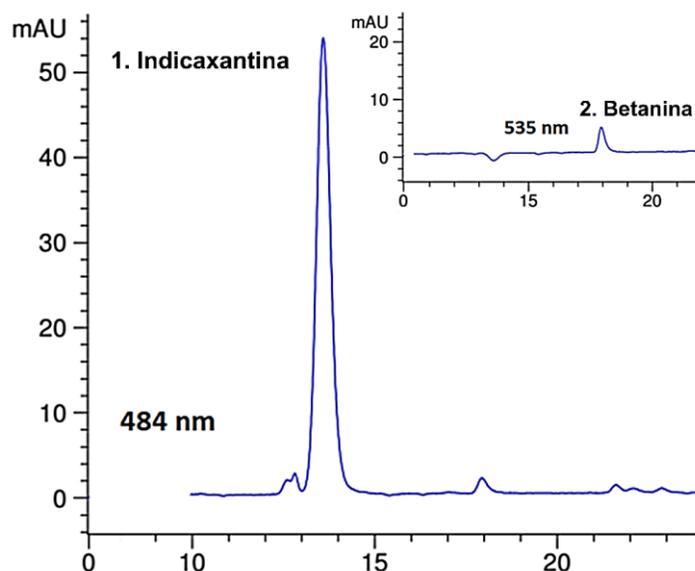


Figura 10. Cromatogramas obtenidos por HPLC de la pulpa de tuna anaranjada a 484 nm (indicaxantina, imagen principal) y 535 nm (betanina, imagen pequeña insertada).

El contenido de polifenoles totales fue de 683,4 mg EAG L<sup>-1</sup>, dentro del rango de polifenoles totales reportados para tuna amarilla-anaranjada por varios autores, entre 247 y 746 mg EAG L<sup>-1</sup> (Galati *et al.*, 2003; Stintzing *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2009). La capacidad antioxidante (ORAC) (12,2 mmol ET kg<sup>-1</sup>) fue mayor a la reportada en pulpa amarilla (5,3 mmol ET kg<sup>-1</sup>) (Butera *et al.*, 2002), pero menor a los valores reportados por Jiménez-Aguilar *et al.* (2014), entre 15,8 y 49,2 mmol ET kg<sup>-1</sup>. Estas diferencias se pueden explicar por la influencia del riego, el momento de la cosecha, madurez de la fruta y otros factores estresantes que afectan la producción de metabolitos secundarios en la planta (Sáenz y Sepúlveda, 2001b; Cota-Sánchez, 2016).

### **3.2. Características físicas y químicas del mucílago de las paletas de *Opuntia ficus-indica***

Las características del mucílago están influenciadas entre otros factores, por el método de extracción, la edad de las paletas y las condiciones climáticas o de riego a la que están sometidas las plantas, que provocan un incremento en la síntesis de mucílago durante épocas de sequía para retener agua (Sáenz *et al.*, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2007). Sin embargo, la alta humedad y actividad de agua del mucílago lo hacen susceptible a un rápido deterioro microbiano; por lo cual debe ser usado en un corto tiempo después de extraerlo o secarlo y reconstituirlo para su uso posterior (Contreras-Padilla *et al.*, 2012).

La Tabla 4 muestra las características físicas y químicas del mucílago (M) extraído desde la paleta de tuna *O. ficus-indica* (Figura 11), así como el producto en polvo obtenido por secado por atomización (MS) y dispersado en agua (MR). Los resultados de MS no se compararon con M y MR, pues era de esperarse un cambio significativo por efecto del secado.

El pH del mucílago recién extraído de las paletas (M) fue significativamente mayor que el del mucílago dispersado en agua (MR). Ambos valores fueron mayores al mucílago extraído mecánicamente sin uso de solventes (4,26 – 4,2) (Reyes-Ocampo *et al.*, 2019), y al mucílago extraído mediante varios métodos, térmicos y no térmicos (4,8 – 5,0) (Monroy-Gutiérrez *et al.*, 2017). Las diferencias en pH y acidez entre M y MR pueden atribuirse al proceso de secado, ya que la alta temperatura de secado empleada (166 °C), podría inducir una hidrólisis parcial del polímero, liberando fragmentos ácidos presentes en la composición heterogénea de este polisacárido, el cual tiene varias fracciones ácidas y neutras (Sáenz *et al.*, 2004).

El valor de polifenoles totales fue significativamente mayor en MR respecto a M, sin embargo, para la capacidad antioxidante no se encontraron diferencias significativas. En otro trabajo en polvos de nueve variedades de *Opuntia* (México)

obtenidos por secado en horno a 60 °C por 8 – 9 h y molienda, se reportaron valores de polifenoles totales (32 a 90 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) y capacidad antioxidante (26 a 74 mmol ET 100 g<sup>-1</sup>) menores a los obtenidos en este estudio para MS (578,5 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> y 138,3 mmol ET 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente) (Santos-Zea *et al.*, 2011). Lee *et al.* (2002) reportaron 370 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> en cladodios liofilizados de nopal de edad comercial, valor que fue menor al obtenido en MS, y 18030 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> en un extracto etanólico obtenido a partir de estos; mientras que Corral-Aguayo *et al.* (2008) reportaron 209 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> y 0,05 mmol ET g<sup>-1</sup> en paletas de nopal en edad para consumo fresco (nopalitos). Las diferencias observadas pueden atribuirse a las concentraciones de los distintos extractos, a los procesos de secado y la edad de las paletas, factores que como se ha mencionado anteriormente, influyen en las características de las paletas de nopal y en el mucílago.

Tabla 4. Características físicas y químicas del mucílago extraído de la paleta, secado por atomización y dispersado en agua

<b>Parámetro</b>	<b>M†</b>	<b>MR†</b>	<b>MS†</b>
Humedad (%)	99,2 ± 0,62 <sup>a</sup>	99,2 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,3
Actividad de agua	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1
Sólidos solubles (° Brix)	0,8 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,06 <sup>a</sup>	NA
pH	6,1 ± 0,27 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,06 <sup>b</sup>	NA
Acidez (% ácido cítrico)	0,003 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,014 ± 0,001 <sup>a</sup>	NA
Fenoles (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	7,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	11,2 ± 0,07 <sup>a</sup>	578,5 ± 14,9
Capacidad antioxidante	0,7 ± 0,15 <sup>a*</sup>	0,8 ± 0,08 <sup>a*</sup>	138,3 ± 14,3 <sup>**</sup>
Solubilidad (%)	NA	NA	91,7 ± 3,9
Higroscopicidad (g 100 g <sup>-1</sup> )	NA	NA	52,4 ± 1,4
Cap. hinchamiento (mL g <sup>-1</sup> )	NA	NA	4,1 ± 0,8
<b>Parámetros de color</b>			
L*	98,18 ± 2,06 <sup>b</sup>	92,28 ± 1,00 <sup>a</sup>	77,7 ± 1,3
C*	4,82 ± 1,75 <sup>a</sup>	5,73 ± 0,56 <sup>a</sup>	9,1 ± 1,2
h°	98,44 ± 4,22 <sup>a</sup>	94,87 ± 0,8 <sup>a</sup>	77,8 ± 1,8

ET: equivalentes a Trolox, EAG: equivalentes a ácido gálico, M: mucílago, MS: mucílago seco, MR: mucílago seco dispersado en agua, NA: no aplica, \*: expresado como mmol ET L<sup>-1</sup>, \*\*: expresado como mmol ET g<sup>-1</sup>, †: medias de tres réplicas ± desviación estándar, letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0,05) y la letra a representa el valor más alto.

En la Figura 11 se observa la planta de la que se sacaron los cladodios, el mucílago extraído y el mucílago en polvo.

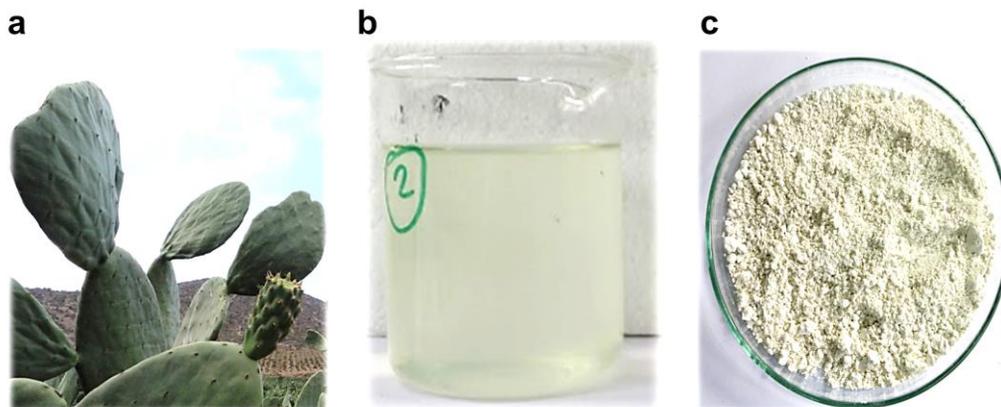


Figura 11. Paletas de nopal (a), mucílago extraído de las paletas (b) y secado por atomización (c).

El polvo MS presentó una humedad y actividad de agua, a la temperatura del aire a la entrada al secador empleada (166 °C), en el rango reportado por Farías-Cervantes *et al.* (2017), para humedad (8,28% – 1,71%) y  $a_w$  (0,43 – 0,18) en mucílagos secados por atomización a temperaturas de entrada al secador entre 70 y 110 °C. La humedad además estuvo por debajo del valor reportado en mucílagos (10,7% – 4,4%) secados por atomización a temperaturas de entrada al secador entre 130 – 170 °C (León-Martínez *et al.*, 2010). En general temperaturas más altas provocan una menor humedad, debido a la existencia de un mayor gradiente de temperatura entre la alimentación y el aire de secado; aunque otros parámetros del proceso, como el flujo de alimentación y la presión de atomización tienen influencia en la humedad final de los polvos (Tonon *et al.*, 2008).

La actividad de agua refleja el agua disponible para reacciones químicas, bioquímicas y microbiológicas del MS. La  $a_w < 0,3$  como en este estudio, permitiría extender la vida útil del mucílago e incrementar sus posibilidades de uso (Contreras-Padilla *et al.*, 2012). La solubilidad estuvo sobre el 90%, cercano a lo reportado anteriormente para mucílago secado por atomización (84%) en las mismas condiciones y por liofilización (82%) (García, 2017). Este alto valor de solubilidad posibilita la dispersión del mucílago en agua para su empleo como agente encapsulante y su aplicación en matrices alimentarias acuosas, y está relacionado con una morfología amorfa del polímero (Yu, 2001).

La higroscopicidad (52,4 g H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup>), que representa la capacidad de absorber agua del ambiente de un polímero, estuvo en el rango reportado por Farías-Cervantes *et al.* (2017), en mucílagos secados a temperaturas de entrada al secador entre 70 y 110 °C (59,1 – 51,9 g H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup>).

Con relación al color, se obtuvo un polvo blanco-crema (Figura 11c), identificado en los parámetros  $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$ . La luminosidad ( $L^*$ ) indica la cantidad luz desde el negro (0) hasta el blanco (100); croma ( $C^*$ ), la intensidad o saturación del color y el ángulo de tono ( $h^\circ$ ) mide la propiedad del color, como proporción de las componentes  $a^*$ (rojo-verde) y  $b^*$  (amarillo-azul). A partir de estos parámetros el color de cada sistema puede ser representado como un punto en el espacio CIELAB y se calcula el cambio de color ( $\Delta E^*$ ) entre cada sistema que representa la distancia euclidiana entre cada punto (Mokrzycki y Tatol, 2011). El valor de  $C^*$  (9,1) fue mayor al reportado en mucílagos precipitados con alcohol y secados en estufa a 70 °C por 4 horas (6,6 – 8,1), mientras que  $L^*$  (77,7) y  $h^\circ$  (77,8) fueron menores (86,6 – 88,9 y 96,2 – 104,7, respectivamente) (Sepúlveda *et al.*, 2007). No se observaron diferencias significativas en  $C^*$  y  $h^\circ$  entre M y MR y la diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) fue de  $6,0 \pm 0,01$ , la que está cerca del límite para considerarse como perceptible ( $\Delta E^* > 5$ ) (Obón *et al.*, 2009). Mientras que la diferencia entre los sistemas líquidos y el sistema en polvo estuvo determinada por el proceso de secado y la eliminación del agua.

### **3.3.Optimización de la encapsulación por secado por atomización de la pulpa de tuna anaranjada**

Se optimizaron las condiciones de encapsulación mediante secado por atomización de la pulpa (P) de tuna anaranjada *Opuntia ficus-indica* con maltodextrina (MD), mucílago de nopal (M) y una mezcla de maltodextrina y mucílago en relación 1:1 (M+MD) como agentes encapsulantes (AE). Por tanto, se evaluaron tres sistemas de micropartículas: pulpa-maltodextrina (P-MD), pulpa-mucílago (P-M) y pulpa-mucílago+maltodextrina (P-M+MD).

La temperatura del aire a la entrada al secador es uno de los parámetros más importantes en el proceso de atomización, pues está directamente relacionado con la velocidad de secado de las gotas (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La relación entre la indicaxantina y el agente encapsulante es otro factor de importancia pues influye directamente en el contenido de sólidos y por tanto en la viscosidad de la mezcla de alimentación, la que puede dificultar la maniobrabilidad (Tontul y Topuz, 2017). Al igual que la temperatura de entrada al secador, la relación activo/polímero influye también en la velocidad de formación de la costra en la superficie de la gota, permitiendo la difusión del agua a la vez que retiene el compuesto de interés (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Por tanto, se consideraron como factores independientes la temperatura del aire de entrada del secador (T) y la relación pulpa/agente encapsulante (P/AE), para maximizar las variables respuesta eficiencia de encapsulación de indicaxantina (EE) y rendimiento del proceso (R). Se empleó un diseño compuesto central (DCC) más punto axial centrado en la cara (distancia axial  $\alpha=1$ ).

Las Tablas 5 – 7 muestran el diseño experimental y el análisis de varianza (ANDEVA) para la encapsulación por secado por atomización de los sistemas de micropartículas de pulpa de tuna anaranjada con maltodextrina (P-MD), mucílago de nopal (P-M) y mucílago-maltodextrina (P-M+MD), respectivamente.

Tabla 5. Diseño experimental, variables respuestas y análisis de varianza para la encapsulación de la pulpa de tuna con maltodextrina (P-MD)

Corrida	Temperatura de entrada (°C) [X <sub>1</sub> ]	Relación P/MD [X <sub>2</sub> ]	EE (%)	R (%)
1	110 [-1]	1:1 [-1]	96,7	40,7
2	180 [+1]	1:1 [-1]	98,2	40,4
3	110 [-1]	5:1 [+1]	92,0	47,2
4	180 [+1]	5:1 [+1]	94,1	45,1
5	110 [-1]	3:1 [0]	94,3	47,0
6	180 [+1]	3:1 [0]	99,2	52,7
7	145 [0]	1:1 [-1]	98,7	47,3
8	145 [0]	5:1 [+1]	96,3	53,5
9	145 [0]	3:1 [0]	99,7	56,8
10	145 [0]	3:1 [0]	98,0	56,7
11	145 [0]	3:1 [0]	99,1	62,3
12	145 [0]	3:1 [0]	99,2	62,0
			<b>p-valor</b>	
X <sub>1</sub>			0,0077*	0,6308
X <sub>2</sub>			0,0018*	0,0330*
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>			0,0058*	0,0014*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>			0,0349*	0,0021*
Falta de ajuste			0,2652	0,7202
R <sup>2</sup>			90,90	91,89
R <sup>2</sup> ajustado (g.l.)			85,71	87,26

P: pulpa de tuna anaranjada, MD: maltodextrina, EE: eficiencia de encapsulación de indicaxantina, R: rendimiento del proceso de secado, g.l.: grados de libertad, \*: efecto estadísticamente significativo. La interacción entre los factores (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) no fue significativa en EE ni en el rendimiento, por lo que se excluyeron del análisis de varianza.

Tabla 6. Diseño experimental, variables respuestas y análisis de varianza para la encapsulación de la pulpa de tuna con mucílago (P-M)

Corrida	Temperatura de entrada (°C) [X <sub>1</sub> ]	Relación P/M [X <sub>2</sub> ]	EE (%)	R (%)
1	110 [-1]	3:1 [-1]	85,9	9,1
2	180 [+1]	3:1 [-1]	89,1	10,8
3	110 [-1]	5:1 [+1]	73,8	8,9
4	180 [+1]	5:1 [+1]	73,5	7,5
5	110 [-1]	4:1 [0]	91,6	5,3
6	180 [+1]	4:1 [0]	92,2	4,8
7	145 [0]	3:1 [-1]	85,2	9,9
8	145 [0]	5:1 [+1]	70,6	5,0
9	145 [0]	4:1 [0]	82,1	3,6
10	145 [0]	4:1 [0]	79,5	4,9
11	145 [0]	4:1 [0]	85,8	5,6
12	145 [0]	4:1 [0]	82,5	4,7
			<b>p-valor</b>	
X <sub>1</sub>			0,6225	0,9476
X <sub>2</sub>			0,0004*	0,0215*
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>			0,0092*	0,1979
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>			0,0023*	0,0007*
Falta de ajuste			0,4404	0,2149
R <sup>2</sup>			90,33	82,11
R <sup>2</sup> ajustado (g.l.)			84,80	75,40

P: pulpa de tuna anaranjada, M: mucílago, EE: eficiencia de encapsulación de indicaxantina, R: rendimiento del proceso de secado, g.l.: grados de libertad, \*: efecto estadísticamente significativo. La interacción entre los factores (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) no fue significativa en EE ni en el rendimiento, por lo que se excluyeron del análisis de varianza.

Tabla 7. Diseño experimental, variables respuestas y análisis de varianza para la encapsulación de la pulpa de tuna con la mezcla mucílago-maltodextrina (1:1) (P-M+MD)

Corrida	Temperatura de entrada (°C) [X <sub>1</sub> ]	Relación P/M+MD [X <sub>2</sub> ]	EE (%)	R (%)
1	110 [-1]	3:1 [-1]	95,2	15,6
2	180 [+1]	3:1 [-1]	93,6	16,3
3	110 [-1]	5:1 [+1]	93,2	15,5
4	180 [+1]	5:1 [+1]	90,0	19,2
5	110 [-1]	4:1 [0]	95,4	4,9
6	180 [+1]	4:1 [0]	92,9	5,1
7	145 [0]	3:1 [-1]	89,9	20,8
8	145 [0]	5:1 [+1]	87,7	31,5
9	145 [0]	4:1 [0]	92,8	20,7
10	145 [0]	4:1 [0]	91,3	20,6
11	145 [0]	4:1 [0]	92,3	15,3
12	145 [0]	4:1 [0]	92,2	18,9
			<b>p-valor</b>	
X <sub>1</sub>			0,0104*	0,5550
X <sub>2</sub>			0,0076*	0,1117
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>			0,0006*	0,0004*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>			0,0037*	0,0014*
Falta de ajuste			0,2332	0,3326
R <sup>2</sup>			90,49	88,43
R <sup>2</sup> ajustado (g.l.)			85,05	81,82

P: pulpa de tuna anaranjada, MD: maltodextrina, M: mucílago, EE: eficiencia de encapsulación de indicaxantina, R: rendimiento del proceso de secado, g.l.: grados de libertad, \*: efecto estadísticamente significativo. La interacción entre los factores (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) no fue significativa en EE ni en el rendimiento, por lo que se excluyeron del análisis de varianza.

### 3.3.1. Eficiencia de encapsulación de indicaxantina (EE)

La eficiencia de encapsulación (EE) representa el porcentaje de indicaxantina que está efectivamente encapsulada dentro de la micropartícula. La EE para P-MD varió entre 92,0% – 99,7%, para P-M entre 70,6% – 92,2% y para P-M+MD entre 87,7% – 95,4%. Aunque en los tres sistemas se alcanzaron valores > 70%, los mayores valores de EE estuvieron en P-MD y P-M+MD, lo que mostró una mayor interacción entre la indicaxantina y los agentes encapsulantes de estos sistemas, la que pudo ser de tipo electrostática y/o por formación de puentes de hidrógeno, ya que la indicaxantina tiene grupos donadores de electrones y grupos hidroxilos, además de nitrógeno amino cargado positivamente (Kanner *et al.*, 2001; Slimen *et al.*, 2017), que podrían interactuar con la carga negativa y grupos hidroxilos de la maltodextrina y el mucílago (Cai y Corke, 2000; Sáenz *et al.*, 2004).

Fernández-López *et al.* (2018) reportaron una EE de betaxantinas de 71%, en extractos de pulpa amarilla de frutos *O. ficus-indica* encapsulados con maltodextrina a 160 °C. Por otra parte, una EE de betalaínas totales entre 94% – 97% se reportaron en la encapsulación de un extracto de betalaínas de pitaya roja, con almidón comercial y modificado (Vargas-Campos *et al.*, 2018).

El análisis de la varianza mostró que en los sistemas P-MD y P-M+MD, las formas lineales y cuadráticas de las variables independientes T y relación P/AE, tuvieron un efecto significativo sobre la EE. Mientras que en el sistema P-M, solo la forma cuadrática de T y las formas lineal y cuadrática de la relación P/AE tuvieron un efecto significativo sobre la EE. Los modelos ajustaron ( $R^2$  ajustado por grados de libertad) en 85,71% para P-MD, 84,80% para P-M y 85,05% para P-M+MD. Los residuales fueron menores a seis y mostraron un patrón aleatorio a ambos lados del cero. La prueba de falta de ajuste fue no significativa en los tres sistemas, por lo que el modelo cuadrático seleccionado fue adecuado para los datos observados y las ecuaciones de los modelos describen el efecto de variables independientes (temperatura y relación P/AE) en la EE de indicaxantina para los sistemas P-MD (ecuación (8)), P-M (ecuación (9)) y P-M+MD (ecuación (10)). En las ecuaciones de los modelos se consideraron los efectos lineales de los factores T y P/AE, incluso cuando no fueron significativos, ya que son la base del experimento. Los efectos cuadráticos de los factores se consideraron en la construcción de la ecuación del modelo cuando fueron significativos sobre las variables respuesta. Las interacciones entre factores no fueron significativas en ningún caso.

Las gráficas de superficie respuesta para EE de la Figura 12 muestran que los mayores valores se alcanzaron para relaciones P/AE entre 1:1 y 3:1 (P-MD) y entre 3:1 y 4:1 (P-M y P-M+MD), con mayor contenido de sólidos en la mezcla de alimentación al secador, lo que facilita la formación de la costra alrededor de las gotas, incrementando la retención de los pigmentos (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

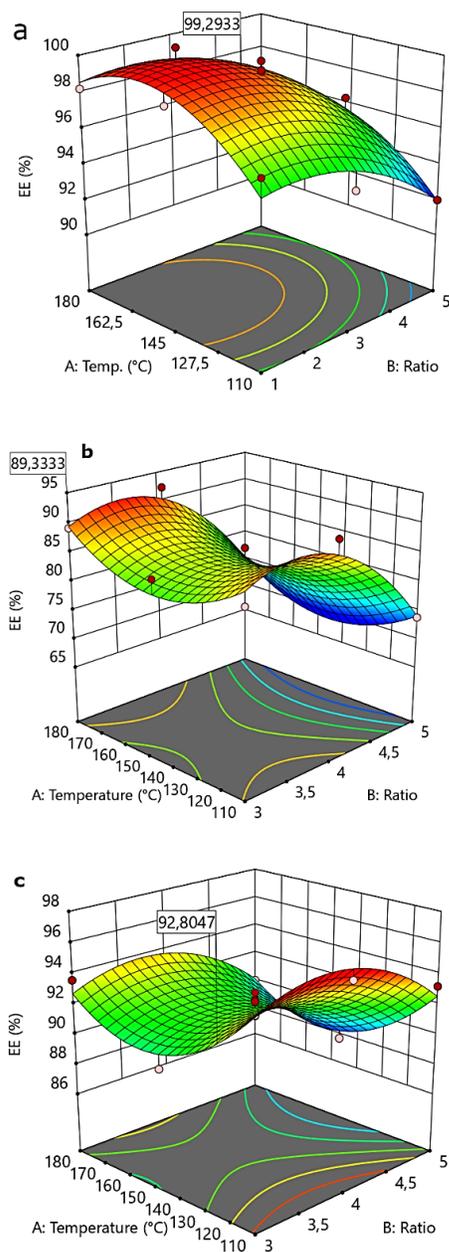


Figura 12. Gráficos de superficie respuesta estimada para la eficiencia de encapsulación de indicaxantina (EE) en los sistemas de micropartículas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c).

Sin embargo, el incremento en la concentración de sólidos en la mezcla a secar es favorable hasta un valor óptimo y luego comienza a ser desfavorable. Chong y Wong (2015) reportaron un aumento del rendimiento en el secado de jugo de níspero con concentraciones de MD desde 10% a 30%, que se mantuvo

constante entre 30% y 40%, pero que disminuyó significativamente con 50% de MD. Al sobrepasar esta cantidad óptima de sólidos, el incremento de la viscosidad en la mezcla de alimentación afecta negativamente el secado (Tontul y Topuz, 2017).

$$EE (\%) = 53,9386 + 0,5731 \times X_1 + 1,3167 \times X_2 - 0,0018 \times X_1^2 - 0,3750 \times X_2^2 \quad (8)$$

$$EE (\%) = 86,0211 - 1,4156 \times X_1 + 56,5500 \times X_2 + 0,0049 \times X_1^2 - 7,9500 \times X_2^2 \quad (9)$$

$$EE (\%) = 119,2299 - 0,7686 \times X_1 + 16,7000 \times X_2 + 0,0025 \times X_1^2 - 2,2500 \times X_2^2 \quad (10)$$

Respecto a la temperatura de entrada al secador, en P-MD se observó un comportamiento tipo cresta empinada en la EE de indicaxantina, donde los mayores valores se obtuvieron en el rango superior (entre 150 y 180 °C), mientras que P-M y P-M+MD, mostraron un comportamiento de la superficie respuesta tipo silla de montar, con los mayores valores de EE de indicaxantina igualmente a altas temperaturas (180 °C) pero también a bajas temperaturas de entrada al secador (110 °C), en tanto que a valores intermedios se obtuvieron las menores EE de indicaxantina.

Otros autores han empleado temperaturas entre 140 y 170 °C para la encapsulación de betaxantinas con distintos agentes encapsulantes (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Gandía-Herrero *et al.*, 2013; Fernández-López *et al.*, 2018; Otálora *et al.*, 2018).

Esto puede indicar que existe una variabilidad en las temperaturas de encapsulación dependiendo del agente encapsulante empleado y las características específicas de los sistemas. Por sobre los 100 °C (sobre la temperatura de ebullición del agua) pero bajo los 200 °C, se produce una rápida formación de la costra alrededor de la gota con una remoción instantánea del agua debido a la diferencia entre la temperatura de secado y temperatura de las partículas, a la vez que se preservan los pigmentos (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Asimismo, la temperatura de secado no solo afecta la encapsulación, sino también la humedad de los polvos obtenidos, disminuyendo con el aumento de la temperatura de entrada al secador, al incrementarse la transferencia de calor a la partícula lo que provee una mayor fuerza para la evaporación del agua desde la gota (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Zuanon *et al.*, 2019).

### 3.3.2. Rendimiento del proceso de secado (R)

El rendimiento (R) representa el porcentaje entre la cantidad de polvo obtenido después del secado y el contenido de sólidos de la solución de alimentación al

secador. R varió entre 40,4% – 62,3% en P-MD, entre 3,6% – 10,8% en P-M y entre 4,9% – 31,5% en P-M+MD.

Hubo una reducción del R al incorporar M en la formulación. Rendimientos entre 53% – 73% y 42% – 82% se reportaron para la encapsulación de betalaínas de pulpa y piel de pitaya roja, respectivamente, con mucílago de nopal (Soto-Castro *et al.*, 2019) y entre 51% – 81% en la encapsulación de betalaínas de betarraga con maltodextrina y almidón modificado (Zuanon *et al.*, 2019). Vergara *et al.* (2014) reportó rendimientos entre 15,5% y 71,5% en pulpa de tuna púrpura encapsulada por secado por atomización con almidón modificado.

No se encontraron antecedentes para R en micropartículas de pulpa de tuna anaranjada; sin embargo, el rendimiento obtenido en P-MD estuvo en el rango de los estudios antes mencionados (Vergara *et al.*, 2014; Soto-Castro *et al.*, 2019; Zuanon *et al.*, 2019). Mientras que en P-M y P-M+MD los valores de R fueron menores, comportamiento que se puede asociar a las características de los agentes encapsulantes empleados (Gharsallaoui *et al.*, 2007). El mucílago es conocido por sus propiedades adhesivas (Cárdenas *et al.*, 1998; Baca y Boyas, 2019), que incrementan la tendencia de las micropartículas a adherirse a la cámara de secado, disminuyendo el rendimiento. Además, las mezclas con mucílago fueron más viscosas que aquellas solo con MD, y como se mencionó anteriormente, una mayor viscosidad provoca una reducción del rendimiento al aumentar los sólidos que se pegan a la cámara de secado (Cai y Corke, 2000).

El análisis de la varianza mostró que en el sistema P-MD, la forma cuadrática de T y las formas lineal y cuadrática de la relación P/AE tuvieron un efecto significativo sobre R. En P-M, solo las formas lineal y cuadrática de la relación P/AE tuvieron un efecto significativo sobre R. Mientras que en P-M+MD las formas cuadráticas de T y de la relación P/AE tuvieron un efecto significativo sobre R. Los modelos ajustaron ( $R^2$  ajustado por grados de libertad) en 87,26% para P-MD, 75,40% para P-M y 81,82% para P-M+MD. Los residuales fueron menores a seis y la prueba de falta de ajuste fue no significativa en los tres sistemas. Las ecuaciones describen el efecto de las variables independientes (T y relación P/AE) en el R durante la encapsulación de los sistemas P-MD (ecuación (11), P-M (ecuación (12)) y P-M+MD (ecuación (13)).

$$R (\%) = -107,9815 + 1,9865 \times X_1 + 13,1125 \times X_2 - 0,0068 \times X_1^2 - 1,9438 \times X_2^2 \quad (11)$$

$$R (\%) = 70,0214 - 0,00095 \times X_1 - 31,1333 \times X_2 + 3,7167 \times X_2^2 \quad (12)$$

$$R (\%) = -43,2260 + 2,7887 \times X_1 - 73,4500 \times X_2 - 0,0095 \times X_1^2 + 9,4625 \times X_2^2 \quad (13)$$

En las ecuaciones de los modelos se consideraron los efectos lineales de los factores T y P/AE, incluso cuando no fueron significativos, ya que son la base del experimento. Los efectos cuadráticos de los factores se consideraron en la

construcción de la ecuación del modelo cuando fueron significativos sobre las variables respuesta. Las interacciones entre factores no fueron significativas en ningún caso por lo que se excluyeron de la construcción del modelo.

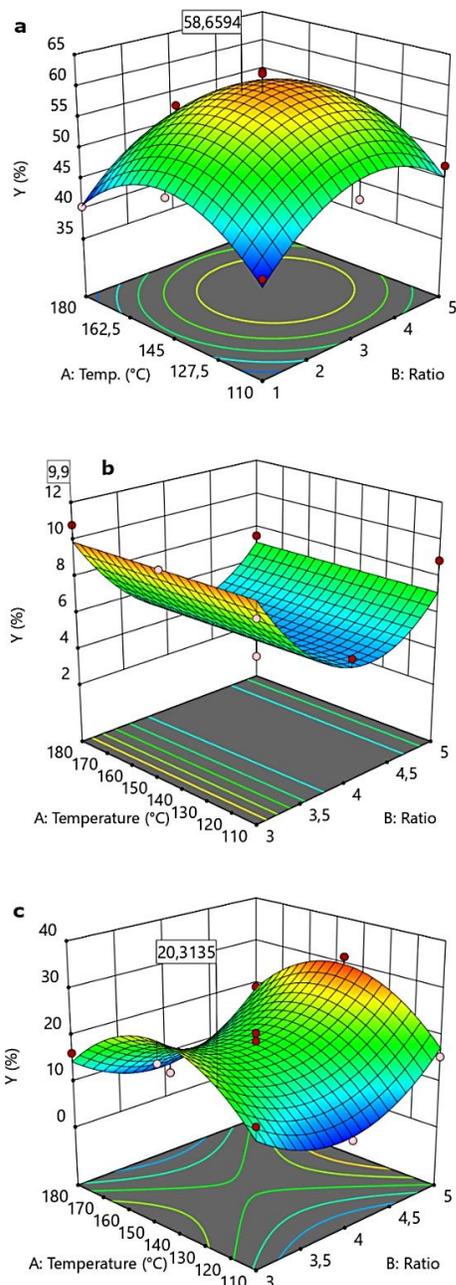


Figura 13. Gráficos de superficie respuesta estimada para el rendimiento (R) en los sistemas de micropartículas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c).

Las gráficas de superficie respuesta en la Figura 13 muestran que el comportamiento del rendimiento fue diferente en todos los sistemas. Como se

mencionó, la temperatura no tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento en P-M. Similares resultados se reportaron en jugo clarificado de níspero con MD (Chong y Wong, 2015) y jugo concentrado de cereza con MD y goma arábica (Karaca *et al.*, 2016).

En P-MD y P-M+MD se encontró un incremento del rendimiento con el aumento de la temperatura del aire de entrada al secador hasta un valor intermedio y luego una disminución del rendimiento. Este comportamiento podría estar asociado a que a medida que se incrementa la temperatura, hasta un valor óptimo, se reduciría la humedad de las partículas, disminuyendo la adherencia a las paredes y favoreciendo su flujo hacia el ciclón. Por encima de este valor óptimo se modificaría el estado gomoso viscoelástico en la superficie del material de encapsulación (Tontul y Topuz, 2017) y también se producirían cambios en la estructura y el comportamiento termoplástico de las sustancias con alto contenido de azúcares, aumentando la adherencia a la cámara de secado, lo que resultaría en un menor rendimiento (Gharsallaoui *et al.*, 2007; León-Martínez *et al.*, 2010).

Respecto a la relación P/AE, los mayores rendimientos se obtuvieron a la relación 3:1 en P-MD y P-M y 5:1 en P-M+MD, aunque en P-M y P-M+MD los valores de rendimiento fueron considerablemente bajos. La información referente al efecto del contenido de encapsulante sobre el rendimiento es contradictoria. Se ha descrito que, en mezclas con bajo contenido de sólidos, los azúcares y otros componentes de la pulpa están más expuestos a la temperatura y las gotas chocan con la cámara de secado pegándose en la superficie, lo que reduce el rendimiento (Tontul y Topuz, 2017). Mientras que con alto contenido de sólidos el incremento en la viscosidad provocaría que las micropartículas se adhieran a la cámara de secado (Cai y Corke, 2000). Además, cuanto más sólidos tiene la mezcla de alimentación, más probable es que choquen con la cámara de secado y se adhieran a esta (Tonon *et al.*, 2008).

### 3.3.3. Función de Deseabilidad (D)

La función de Deseabilidad (D) se empleó para maximizar las dos variables respuesta (EE de indicaxantina y R) y determinar las condiciones óptimas de encapsulación de la pulpa de tuna anaranjada mediante secado por atomización con MD, M y M+MD. La Figura 14 muestra los gráficos de superficie respuesta para la función D, en los tres sistemas estudiados y las zonas con mayor Deseabilidad están señaladas. En P-MD, el valor  $D = 0,889$ , en P-M la  $D = 0,871$  y en P-M+MD la  $D = 0,620$ . Las condiciones óptimas de temperatura y relación P/AE, así como los valores predichos y experimentales de EE y R para los tres sistemas se muestran en la Tabla 8.

En general, la relación P/AE resultó ser una variable más importante en la encapsulación de la pulpa respecto a la temperatura del aire a la entrada al secador. En los tres sistemas la relación óptima P/AE fue 3:1, la que estuvo en el área central del dominio estudiado en P-MD y en el límite inferior en P-M y P-M+MD.

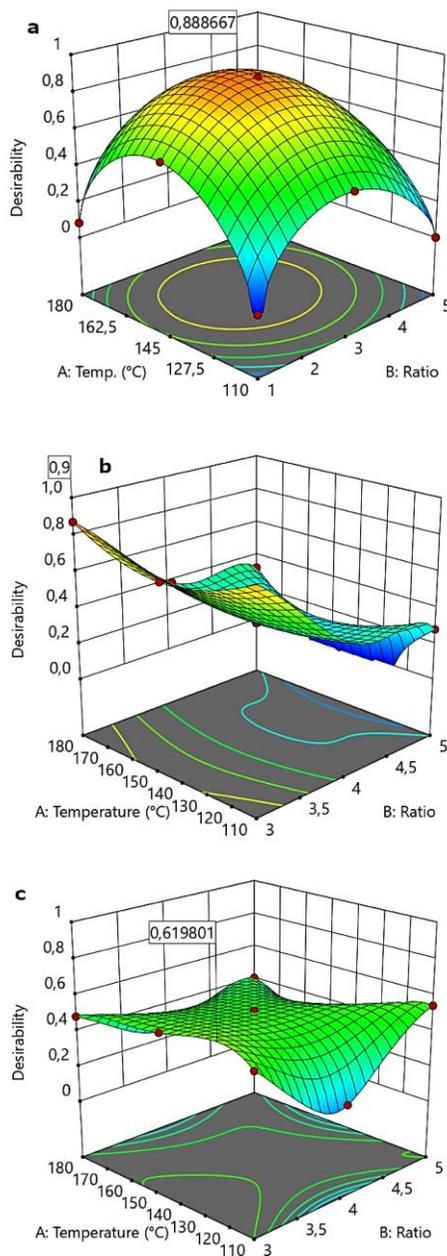


Figura 14. Gráficos de superficie respuesta estimada para la función Deseabilidad (D) en los sistemas de micropartículas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c).

Estas condiciones óptimas fueron iguales a las determinadas en dos estudios de encapsulación de pulpa de tuna púrpura, con MD y almidón modificado (Sáenz *et al.*, 2009; Vergara *et al.*, 2014). Sin embargo, otros que se enfocaron en encapsulación de betaxantinas emplearon relaciones P/MD de 1:1 (Fernández-López *et al.*, 2018) y P/MD/M de 1:1:0,225 (Otálora *et al.*, 2018). En ese sentido, la relación 3:1 aporta una concentración mayor de pigmentos a las mezclas de alimentación que la relación 1:1, lo que representa una ventaja en la producción de colorantes. Además, y hasta donde sabemos, es la primera vez que se reporta una relación P/AE óptima para la encapsulación de la pulpa amarillo-anaranjada de *Opuntia ficus-indica*.

Tabla 8. Condiciones óptimas y respuestas esperadas en la encapsulación de pulpa de tuna anaranjada con MD, M y M+MD

<b>Factor / Respuesta</b>	<b>P-MD</b>	<b>P-M</b>	<b>P-M+MD</b>
Temperatura entrada secador(°C)	150	180	123
Relación P/AE	3:1	3:1	3:1
EE esperada (%)	99,3	89,3	92,8
R esperado (%)	58,7	9,9	20,3

P: pulpa de tuna anaranjada, MD: maltodextrina, M: mucílago, AE: agente encapsulante, EE: eficiencia de encapsulación de indicaxantina, R: rendimiento del proceso de secado.

La temperatura óptima de entrada al secador (150 °C) en P-MD estuvo al centro del dominio estudiado, mientras que en P-M en el límite superior (180 °C) y en P-M+MD cercano al límite inferior (123 °C). Otros autores han empleado temperaturas de 140 °C para la encapsulación de betaxantina con MD y quitosano (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Gandía-Herrero *et al.*, 2013), 160 °C para la encapsulación de un extracto rico en betaxantinas de *O. ficus-indica*, con MD (Fernández-López *et al.*, 2018) o 170 °C para un extracto de betaxantinas de *O. megacantha* con MD-M (Otálora *et al.*, 2018). Estos resultados indican que existe una variabilidad importante en la temperatura óptima de secado, la cual es dependiente del agente encapsulante empleado y es específico para cada sistema (Robert *et al.*, 2015). Por lo tanto, se decidió realizar los estudios posteriores de caracterización, estabilidad y aplicación con micropartículas obtenidas en iguales condiciones, es decir, temperatura de 150 °C (determinada para P-MD e intermedia entre la de P-M y P-M+MD) y relación P/AE 3:1. En estas condiciones, los valores experimentales de EE de indicaxantina estuvieron cercanos a lo predicho en los tres sistemas, mientras que el rendimiento fue menor a lo predicho.

### 3.4. Características de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas

Para comparar el efecto del tipo de agente encapsulante sobre las características de las micropartículas, en igualdad de condiciones, tal como ya se indicó, se prepararon tres sistemas a 150 °C y relación P/AE 3:1, usando maltodextrina (P-MD), mucílago (P-M) y la mezcla 1:1 mucílago-maltodextrina (P-M+MD). El contenido de sólidos de las mezclas alimentadas al secador fue de 14,2%. Este mismo método se ha empleado anteriormente para comparar el efecto de los agentes encapsulantes sobre extractos acuosos de pigmentos de *Amaranthus* (Cai y Corke, 2000). Las características químicas y físicas de las micropartículas en P-MD, P-M y P-M+MD se muestran en la Tabla 9.

La eficiencia de encapsulación estuvo sobre 85% en los tres sistemas estudiados y estuvo en el rango de los reportes de EE de indicaxantina y betalaínas en general, entre 71 y 99%, dependiendo de la temperatura del aire de entrada al secador empleada, así como del tipo y cantidad de agente encapsulante (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Vergara *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2015; Sáenz *et al.*, 2015; Fernández-López *et al.*, 2018; Vargas-Campos *et al.*, 2018). La EE de indicaxantina fue significativamente mayor ( $p > 0,05$ ) para P-MD (100%), seguido por P-M+MD (93,3%) y P-M (87%), por lo que el comportamiento del mucílago como agente encapsulante se ve mejorado al combinarlo con maltodextrina. Este resultado concuerda con lo reportado por Cortés-Camargo *et al.* (2017) en la encapsulación de aceite esencial de limón, quienes reportaron que la encapsulación con mucílago de nopal en combinación con goma de algarrobo aumentaba la EE del aceite esencial hasta un 90,6%. Por otra parte, la concentración de mucílago empleada (14% en P-M) pudo afectar la encapsulación en P-M, ya que en concentraciones mayores a 4% el M mostraría una tendencia a formar redes y agregados macromoleculares, similar a goma xantana o goma guar, lo que dificulta la interacción entre la indicaxantina de la pulpa y el polímero, reduciendo la encapsulación del pigmento (Quinzio *et al.*, 2018).

Respecto al rendimiento, el valor en P-MD (51,2%) fue significativamente mayor que en P-M (7,0%) y P-M+MD (11,6%). Los valores en rendimiento reportados se encuentran entre 15% – 82% para micropartículas de betalaínas, con diferentes condiciones y materiales encapsulantes (Vergara *et al.*, 2014; Soto-Castro *et al.*, 2019; Zuanon *et al.*, 2019). El rendimiento para las micropartículas de P-MD están dentro de estos rangos, mientras que el rendimiento para las micropartículas de P-M y P-M+MD fue significativamente menor. El mucílago es conocido por sus propiedades adhesivas (Cárdenas *et al.*, 1998; Baca y Boyas, 2019), que incrementan la tendencia de las micropartículas a adherirse a las paredes de la cámara de secado, reduciendo el rendimiento. Además, la mayor viscosidad de las mezclas alimentadas con M y M+MD, provocarían una mayor

adherencia del polímero en la cámara de secado, reduciendo el rendimiento (Cai y Corke, 2000).

Tabla 9. Características químicas y físicas de las micropartículas obtenidas a 150 °C y relación 3:1 de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD

Parámetro <sup>†</sup>	P-MD	P-M	P-M+MD
EE indicaxantina (%)	100,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	87,0 ± 0,45 <sup>c</sup>	93,3 ± 0,25 <sup>b</sup>
Rendimiento (%)	51,2 ± 0,78 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,64 <sup>c</sup>	11,6 ± 1,09 <sup>b</sup>
Betaxantinas (mg EI 100 g <sup>-1</sup> )	18,9 ± 0,87 <sup>a</sup>	19,8 ± 0,66 <sup>a</sup>	18,0 ± 0,77 <sup>a</sup>
Polifenoles totales <sup>§</sup>	425,9 ± 13,35 <sup>c</sup>	624,7 ± 8,3 <sup>a</sup>	590,2 ± 2,87 <sup>b</sup>
Capacidad antioxidante <sup>‡</sup>	87,7 ± 4,35 <sup>c</sup>	176,9 ± 3,44 <sup>a</sup>	116,2 ± 1,25 <sup>b</sup>
Humedad (%)	3,7 ± 0,55 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,5 <sup>b</sup>
Actividad de agua	0,278 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,289 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,251 ± 0,005 <sup>c</sup>
Higroscopicidad (g H <sub>2</sub> O 100 g <sup>-1</sup> )	21,3 ± 2,54 <sup>b</sup>	31,5 ± 4,24 <sup>a</sup>	24,0 ± 2,32 <sup>ab</sup>
Solubilidad (%)	96,6 ± 3,94 <sup>a</sup>	91,2 ± 3,48 <sup>a</sup>	92,6 ± 3,83 <sup>a</sup>
Tg (°C)	40,54	40,01	41,58
<b>Parámetros de Color</b>			
L*	91,99 ± 0,08 <sup>a</sup>	88,57 ± 0,03 <sup>c</sup>	90,24 ± 0,03 <sup>b</sup>
C*	24,11 ± 0,09 <sup>c</sup>	27,54 ± 0,04 <sup>a</sup>	25,67 ± 0,02 <sup>b</sup>
h°	89,50 ± 0,04 <sup>b</sup>	88,47 ± 0,06 <sup>c</sup>	89,70 ± 0,02 <sup>a</sup>
ΔE* vs. pulpa	74,97 ± 0,04 <sup>a</sup>	70,69 ± 0,02 <sup>c</sup>	73,00 ± 0,02 <sup>b</sup>

P: pulpa de tuna, MD: maltodextrina, M: mucílago, EE: eficiencia de encapsulación, EI: equivalente a indicaxantina, Tg: temperatura de transición vítrea, ΔE\* vs. pulpa: diferencia de color entre micropartículas y pulpa de tuna anaranjada, ‡: expresado como mmol equivalentes a Trolox g<sup>-1</sup>, §: expresado como mg equivalente a ácido gálico 100 g<sup>-1</sup>, †: medias de tres réplicas ± desviación estándar, letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0,05) y la letra a representa el valor más alto.

En el caso de P-M y P-M+MD para aumentar el rendimiento al reducir la adherencia a la cámara de secado, se han reportado enfoques basados en el uso de otros materiales en combinación con el polímero o en la modificación del proceso de secado por atomización (Tontul y Topuz, 2017).

Estudios recientes han demostrado que las proteínas (como aislado de proteína de suero, caseinato de sodio y/o aislado de proteína de soya) aumentan el rendimiento durante el secado incluso en concentraciones bajas (0,5% – 5%), debido a la migración preferencial de la proteína a la interfaz gota-aire y a la

formación en la superficie de las partículas de una película de alto contenido proteínico con propiedades vítreas, que evitan interacciones con la cámara de secado, aumentando el rendimiento (Wang *et al.*, 2011; Fang y Bhandari, 2012).

El raspado mecánico del equipo de secado, la introducción de aire frío desde el fondo o la reducción del flujo de alimentación a una presión de atomización constante, que disminuye el tamaño de las gotas, aumentando la eliminación de agua y el rendimiento, son algunos ejemplos de los enfoques basados en el proceso para aumentar el rendimiento (Tontul y Topuz, 2017). Por lo tanto, futuros intentos de mejorar el rendimiento utilizando el mucílago como agente encapsulante podrían incluir la combinación con aislados de proteínas que aumenten el rendimiento a baja concentración o la optimización de parámetros del proceso como el flujo de alimentación o la presión de atomización.

Por otro lado, los polifenoles totales y la capacidad antioxidante fueron significativamente más altos en los sistemas con mayor contenido de mucílago (P-M > P-M+MD > P-MD), lo que está en correspondencia con el alto contenido de polifenoles encontrado en el mucílago. Por tanto, la presencia del mucílago en las micropartículas aumentó el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante, respecto a las micropartículas sin mucílago.

La humedad menor a 6,6% y la actividad de agua menor a 0,3 encontrada en las micropartículas puede ser atribuida a la temperatura de secado de 150 °C, mientras que P-M alcanzó el valor más alto de humedad (6,6%) respecto a P-MD (3,7%) y P-M+MD (4,5%). Valores similares de actividad de agua y humedad se han reportado en micropartículas de tuna púrpura encapsuladas con MD (0,176 y 2,9%, respectivamente) y M+MD (0,205 y 4,8%, respectivamente), usando mayores temperaturas del aire de entrada al secador (170 °C) (Otálora *et al.*, 2015). La humedad y la  $a_w$  son factores importantes en la vida útil de ingredientes en polvo. Valores de humedad bajo 10% y  $a_w$  menores a 0,6 permiten una mayor estabilidad microbiológica y además hay una menor movilidad de reactantes (Martins *et al.*, 2017), que disminuye la posibilidad de reacciones de pardeamiento e hidrolíticas en las partículas y su almacenamiento prolongado (Chong y Wong, 2015; Damodaran, 2017).

Asimismo, la higroscopicidad de las micropartículas fue mayor en el sistema P-M (31,5 g H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup>), lo que se puede atribuir a los grupos hidrofílicos del mucílago (Farías-Cervantes *et al.*, 2017). Valores más altos se reportaron para betaninas de *Amaranthus* encapsuladas con maltodextrina ED 15 – 20 (47 – 58 g H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup>) (Cai y Corke, 2000). Mientras que valores menores entre 14 – 17 g H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> se reportaron en polvos secados por atomización de pitaya roja, con maltodextrina como encapsulante (Shaaruddin *et al.*, 2017).

La solubilidad de los tres sistemas estuvo sobre 90% y no presentó diferencias estadísticamente significativas. En los sistemas con mucílago esta alta

solubilidad pudo estar influenciada por el método de extracción utilizado (extracción acuosa), ya que se ha reportado que el mucílago obtenido por precipitación con etanol es menos soluble (León-Martínez *et al.*, 2010; García, 2017). La solubilidad de las micropartículas estudiadas fue mayor a la reportada en micropartículas de jugo de níspero secado con maltodextrina (85% – 90%) (Chong y Wong, 2015) y micropartículas de jugo de mango con maltodextrina y celulosa (72% – 90%) (Cano-Chauca *et al.*, 2005), por lo que se pueden considerar como un polvo adecuado para formulaciones de jugos o bebidas instantáneas.

En los tres sistemas el software empleado (Pyris 11, PerkinElmer, Waltham, MA, Estados Unidos) determinó una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de alrededor de 40 °C (Anexo IX). Valores de  $T_g$  entre 40 y 50 °C se han reportado para sistemas con maltodextrina (ED: 15 – 20), en micropartículas de amaranto y de pulpa de tuna púrpura (Cai y Corke, 2000; Otálora *et al.*, 2015); mientras que empleando MD+M para encapsular pulpa de tuna púrpura y anaranjada se ha reportado valores de 40 y 52 °C, respectivamente (Otálora *et al.*, 2015; Otálora *et al.*, 2018). La maltodextrina y el mucílago son polisacáridos con diferentes estructuras químicas, que interactúan con otros componentes de las mezclas (agua, betaxantinas) mediante interacciones tipo dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno, causando variaciones en la estructura polimérica y con agregados moleculares, lo que puede producir pequeñas diferencias en las temperaturas de transición vítrea (Otálora *et al.*, 2015; Otálora *et al.*, 2018).

En la Figura 15 se observan las micropartículas de los tres sistemas (P-MD, P-M y P-M+MD) obtenidas por secado por atomización en condiciones óptimas (150 °C y relación P/AE de 3:1).



Figura 15. Micropartículas de pulpa de tuna anaranjada obtenidas en condiciones óptimas (150 °C y relación P/AE 3:1) de los sistemas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c).

Respecto al color de las micropartículas (Figura 15 y Tabla 9), la luminosidad ( $L^*$ ) y el ángulo de tono ( $h^\circ$ ) aumentaron, mientras que la croma ( $C^*$ ) disminuyó en los tres sistemas, con respecto a los valores de la pulpa, mencionados

anteriormente ( $L^* = 31,3$ ,  $C^* = 62,6$  y  $h^\circ = 57,6$ ). Se obtuvo un cambio de color ( $\Delta E^*$ ), entre cada sistema y la pulpa, de 75,0 (P-MD), 70,7 (P-M) y 73,0 (P-M+MD), como resultado de la encapsulación de la indicaxantina; además MD y M mostraron mayores valores de  $L^*$  y un  $h^\circ$  de tono más amarillo. Resultados similares se han descrito anteriormente en pulpa anaranjada de *O. megacantha* encapsulada con MD (Otálora *et al.*, 2018). Entre los tres sistemas se encontraron diferencias significativas en los parámetros de color, determinadas principalmente por el agente encapsulante, con  $\Delta E^*$  de 4,9 (P-MD vs. P-M), 2,3 (P-MD vs. P-M+MD) y 2,6 (P-M vs. P-M+MD). En otros resultados, Carmona *et al.* (2019) reportaron un cambio de color de 43,1 en polvo de pulpa de tuna anaranjada secada por liofilización comparados con la pulpa fresca, usando maltodextrina como *carrier* en relación 1:1 (sólidos pulpa/MD). Las diferencias en los resultados pueden ser atribuidas a las distintas cantidades de MD empleadas, así como al método de secado empleado, a bajas temperaturas. Por otro lado, es posible que durante la liofilización parte de la pulpa se haya encapsulado. Sin embargo, el principal objetivo de la MD fue actuar como facilitador del proceso de secado. Por tanto, el polvo final sería distinto al obtenido por secado por atomización, lo que conlleva a la obtención de un color diferente.

### 3.5. Estabilidad de las micropartículas almacenadas a 5, 37 y 60 °C

La temperatura es considerada como el factor más crítico que afecta la estabilidad de las betalaínas, que son compuestos termolábiles que sufren un rápido deterioro con pérdida del color (Herbach *et al.*, 2006; Khan, 2016; Martins *et al.*, 2017). Las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas (150 °C y relación P/AE 3:1) de los tres sistemas (P-MD, P-M y P-M+MD) se almacenaron en ausencia de luz a  $5 \pm 2$ ,  $37 \pm 2$  y  $60 \pm 2$  °C, para evaluar la estabilidad de la indicaxantina y el color, durante 7 semanas.

En la Figura 16 se muestra la retención de indicaxantina durante el almacenamiento en los tres sistemas de micropartículas a las temperaturas estudiadas, donde se puede observar una mayor estabilidad del pigmento a la menor temperatura de almacenamiento. En este gráfico, las letras mayúsculas distintas entre sistemas representan diferencias significativas, por días y las letras minúsculas distintas entre días representan diferencias significativas, por sistemas. Las letras A y a representan los valores más altos.

A los 49 días de almacenamiento a 5 °C se observó una alta retención de indicaxantina, con valores del 100% para P-MD y P-M+MD y de 88% para P-M. De similar forma, a 37 °C la retención de indicaxantina en P-MD y en P-M+MD fue de 99% y 96%, respectivamente; mientras que para P-M disminuyó considerablemente (49%). En tanto, a 60 °C la retención de indicaxantina en P-MD continuó siendo alta (89%) y menor en los sistemas de micropartículas P-

M+MD (60%) y P-M (32%). Las diferencias en los resultados de estabilidad entre los sistemas están en concordancia con lo planteado por Vergara *et al.* (2014) quien consideró la higroscopicidad del mucílago como un factor crítico en la estabilidad durante el almacenamiento de las micropartículas. En los sistemas con presencia de M (P-M y P-M+MD), la indicaxantina se degradaría por una reacción de hidrólisis, produciéndose la pérdida del pigmento y el color (Herbach *et al.*, 2006).

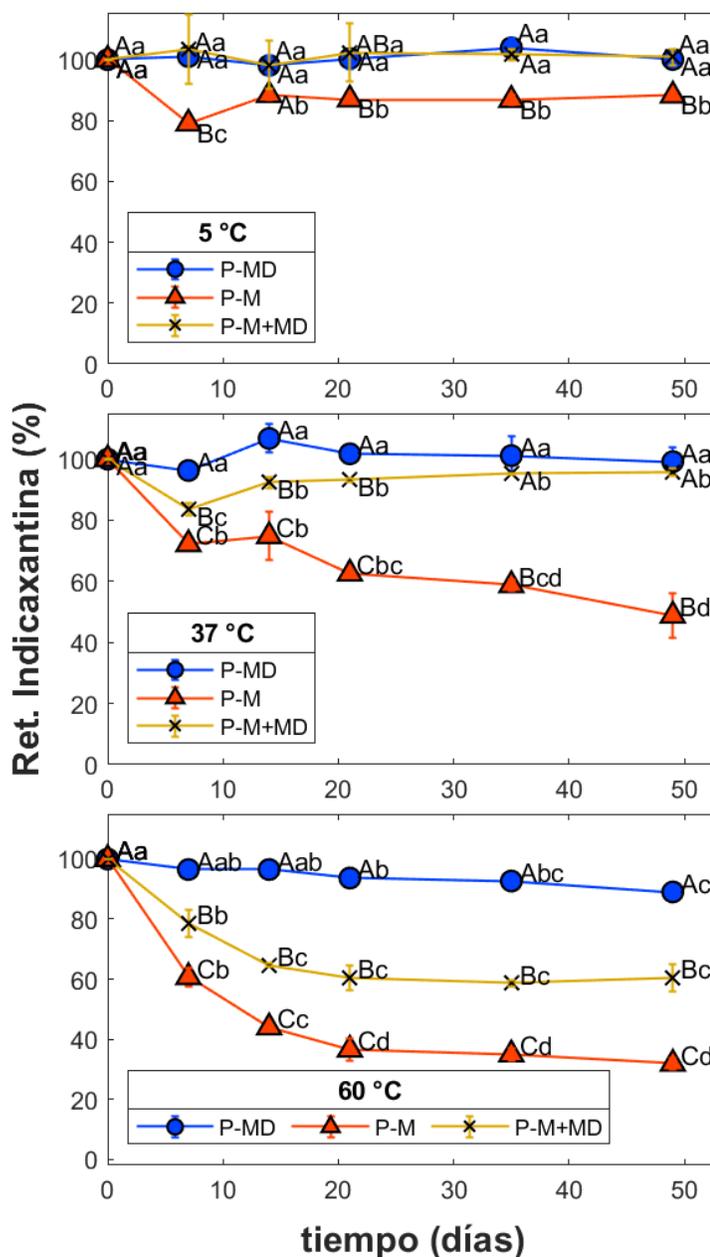


Figura 16. Porcentaje de retención de indicaxantina de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas durante el almacenamiento a 5, 37 y 60 °C.

Una retención de indicaxantina cercana a 100% fue reportada en micropartículas de indicaxantina purificada con maltodextrina, almacenadas a 4 y 20 °C por 60 días (Gandía-Herrero *et al.*, 2010); mientras que 96% y 98% de retención fue reportado en un extracto centrifugado de pulpa de *O. ficus-indica*, en iguales condiciones (60 días a 4 y 20 °C, respetivamente) (Fernández-López *et al.*, 2018). Soto-Castro *et al.* (2019) reportaron una retención de 72,4% – 98,8% en pulpa y piel de pitaya encapsuladas con mucílago de nopal después de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Zuanon *et al.* (2019) reportaron retenciones entre 13% y 52% en micropartículas de extracto de betarraga encapsuladas con mezclas de maltodextrina y almidón modificado, almacenadas a 25 °C durante 3 meses. Comparados con estos resultados, la retención de indicaxantina determinada en este estudio fue similar e incluso mayor, en similares temperaturas, considerando que una mayor temperatura de almacenamiento constituye un factor crítico para la estabilidad de las betalaínas, que aceleraría la degradación de la indicaxantina, como ya se ha mencionado. Altas temperaturas (> 50 °C) o incluso temperatura ambiente (~ 25 °C) pueden provocar reacciones de hidrólisis en las betalaínas, mientras que bajo refrigeración ( $\leq 4$  °C), se observa una mayor estabilidad de estos pigmentos (Martins *et al.*, 2017).

La forma en que el pigmento se ha encapsulado (purificado o en pulpa) podría tener también influencia en la estabilidad. La presencia de azúcares y mucílago en la pulpa influyen la estabilidad de la indicaxantina durante el almacenamiento, ya que el mucílago tiene una alta capacidad de absorción de agua y los azúcares pueden ser solubilizados, ambos incrementando el agua disponible para reacciones de degradación (Vergara *et al.*, 2014). Por otro lado, algunos autores han sugerido que la presencia de otros compuestos (azúcares, ácidos orgánicos, pectinas) incrementan la estabilidad de las betalaínas, comparadas con soluciones de los pigmentos puros, reduciendo la necesidad de un proceso de purificación o extracción (Moßhammer *et al.*, 2005a; Herbach *et al.*, 2006).

Sin embargo, en los parámetros de color de la micropartículas durante el almacenamiento a las tres temperaturas estudiadas (Figura 17), se observaron mayores cambios totales de  $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$  a mayor temperatura y con mayor presencia de mucílago, que podrían no estar relacionados a la degradación de la indicaxantina, sino a otros procesos degradativos. En la Figura 18 están representadas las variaciones  $\Delta L^*$ ,  $\Delta C^*$  y  $\Delta h^\circ$  entre el inicio y el final del almacenamiento de las micropartículas a 5, 37 y 60 °C. En este gráfico, las letras minúsculas distintas representan diferencias significativas entre sistemas en cada parámetro y la letra a representa el valor más alto.

Respecto al valor de  $L^*$ , a 5 °C hubo una disminución que no fue significativamente diferente entre los sistemas; mientras que, a 37 °C y a 60 °C,

la reducción de  $L^*$  fue significativamente mayor (entre 10 y 20 veces) con la presencia de mucílago (P-MD y P-M+MD).

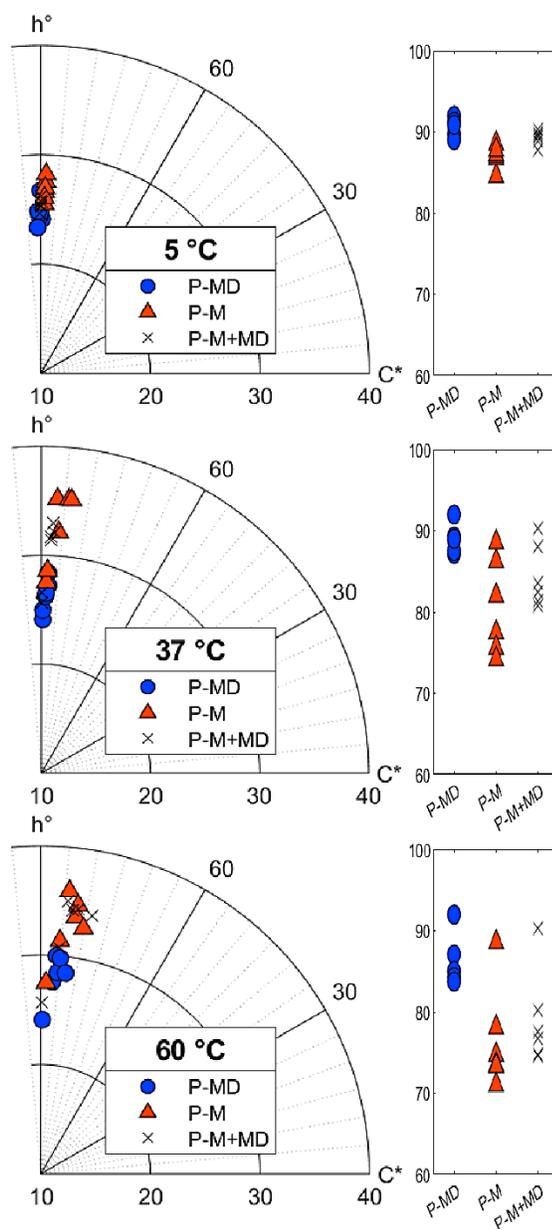


Figura 17. Cambio en los parámetros  $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$  de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD durante las 7 semanas de almacenamiento a 5, 37 y 60 °C.

En cuanto a  $C^*$ , a 5 °C se observó una disminución no significativa entre los sistemas, como en  $L^*$ . Contrariamente, a 37 °C y a 60 °C, el valor de  $C^*$  se

incrementó durante el almacenamiento, con una variación significativamente mayor con la presencia de mucílago en P-M y P-M+MD.

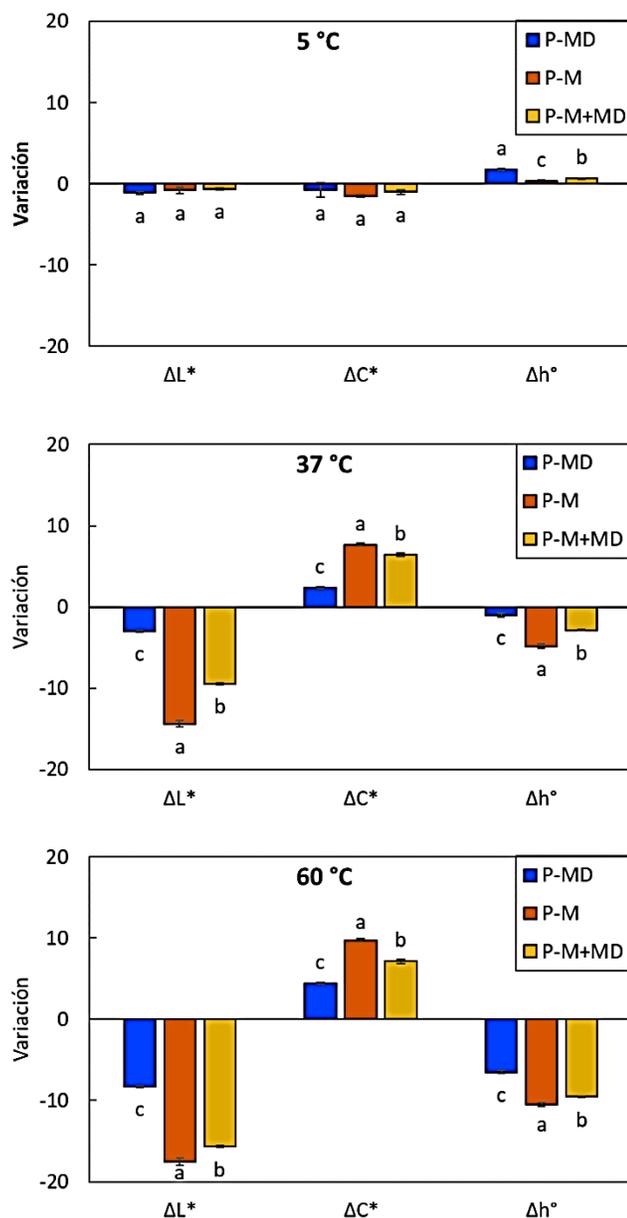


Figura 18. Variación de los parámetros de color ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta C^*$  y  $\Delta h^\circ$ ) entre el inicio y el fin del almacenamiento (7 semanas) de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5, 37 y 60 °C.

Con relación al ángulo de tono ( $h^\circ$ ), a 5 °C hubo un aumento en los tres sistemas; mientras que a 37 °C y 60 °C hubo una reducción de  $h^\circ$ , siendo significativamente mayor con la presencia de mucílago (P-M y P-M+MD). De modo general, el

almacenamiento de las micropartículas en refrigeración no afectó los parámetros de color, mientras que a temperaturas más altas y principalmente cuando había mucílago en las micropartículas, el color de los polvos se volvió más oscuro, sugiriendo una reacción de pardeamiento además de la degradación de la indicaxantina.

Gandía-Herrero *et al.* (2010) reportaron un incremento de  $L^*$  de 0,45, de  $C^*$  de 0,13 y de  $h^\circ$  de 1,8 en micropartículas de indicaxantina encapsuladas con maltodextrina almacenadas a 20 °C en oscuridad, durante 6 meses, con un cambio del color de los polvos hacia tonos más claros o tenues, como consecuencia de la degradación de la indicaxantina. Mientras que, en micropartículas de miraxantina V en iguales condiciones, encapsuladas con maltodextrina, se reportó un  $\Delta L^*$  de -0,75, un  $\Delta C^*$  de -5,02 y un  $\Delta h^\circ$  de 0,81 y en micropartículas encapsuladas con quitosano, un  $\Delta L^*$  de 2,53, un  $\Delta C^*$  de -19,67 y un  $\Delta h^\circ$  de 0,12 (Gandía-Herrero *et al.*, 2013). Estos resultados implicaron que los parámetros de color de las micropartículas no cambiaron notablemente durante el tiempo de almacenamiento en ausencia de luz, independientemente del AE empleado, a excepción de  $C^*$  que disminuyó significativamente con el quitosano (Gandía-Herrero *et al.*, 2013).

En otros estudios, Zuanon *et al.* (2019) reportaron en un extracto rico en betalainas de betarraga encapsulado con mezclas de maltodextrina y almidón modificado, cambios en  $L^*$  entre -2,12 y 5,65, en  $C^*$  entre -15,61 y -5,08 y en  $h^\circ$  entre 14,91 y 19,78, lo que significó una reducción de la contribución de rojo en las micropartículas, con lo que el color del polvo se volvió menos intenso y más opaco. Asimismo, Galdino *et al.* (2016) reportaron en micropartículas de pulpa de tuna amarilla *Opuntia ficus-indica* encapsulada con maltodextrina y almacenadas durante 40 días a 25 °C un  $\Delta L^*$  de 0,0, un  $\Delta C^*$  de -1,52 y un  $\Delta h^\circ$  de 0,69; mientras que a 40 °C el  $\Delta L^*$  fue de 0,47, el  $\Delta C^*$  fue de -1,65 y el  $\Delta h^\circ$  de -0,02. Estos resultados permitieron a los autores concluir que la luminosidad de las micropartículas se mantuvo casi constante desde el principio hasta el final del tiempo de almacenamiento y que el predominio del color amarillo no se afectó. Los resultados del presente estudio son comparables a los reportados anteriormente, a baja temperatura y utilizando maltodextrina como agente encapsulante. Con el mucílago como AE no es posible comparar, ya que la aparición del pardeamiento no ha sido descrita en los artículos mencionados.

El índice de pardeamiento (IP) ha sido usado anteriormente para describir cambios de color cuando hay reacciones de pardeamiento, sea de tipo enzimático o no enzimático. El IP representa la pureza del color marrón y es uno de los indicadores más comunes del pardeamiento en alimentos que contienen azúcares (Palou *et al.*, 1999; Saricoban y Yilmaz, 2010; Lunadei *et al.*, 2011). En la Tabla 10 se muestran los valores de IP de las micropartículas al inicio y final del almacenamiento, así como el cambio experimentado, a las tres temperaturas evaluadas.

Tabla 10. Índice de pardeamiento (inicial, final y variación) de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD almacenadas a 5, 37 y 60 °C

	<b>P-MD</b>	<b>P-M</b>	<b>P-M+MD</b>
IP día 0	29,5 ± 0,10 <sup>Cc</sup>	36,5 ± 0,04 <sup>Ca</sup>	32,4 ± 0,03 <sup>Cb</sup>
<b>5 °C</b>			
IP día 49	28,2 ± 1,15 <sup>Cc</sup>	34,4 ± 0,05 <sup>Da</sup>	30,9 ± 0,29 <sup>Db</sup>
$\Delta$ IP	-1,3 ± 1,18 <sup>Ca</sup>	-2,1 ± 0,06 <sup>Ca</sup>	-1,5 ± 0,30 <sup>Ca</sup>
<b>37 °C</b>			
IP día 49	34,7 ± 0,25 <sup>Bc</sup>	64,9 ± 0,75 <sup>Ba</sup>	50,2 ± 0,43 <sup>Bb</sup>
$\Delta$ IP	5,2 ± 0,25 <sup>Bc</sup>	28,4 ± 0,76 <sup>Ba</sup>	17,8 ± 0,42 <sup>Bb</sup>
<b>60 °C</b>			
IP día 49	42,9 ± 0,28 <sup>Ac</sup>	76,6 ± 0,85 <sup>Aa</sup>	59,6 ± 0,07 <sup>Ab</sup>
$\Delta$ IP	13,5 ± 0,28 <sup>Ac</sup>	40,2 ± 0,85 <sup>Aa</sup>	27,2 ± 0,07 <sup>Ab</sup>

P: pulpa de tuna, MD: maltodextrina, M: mucílago, IP: índice de pardeamiento,  $\Delta$ IP: variación en el índice de pardeamiento, letras minúsculas distintas en la misma fila representan diferencias significativas entre sistemas a una misma temperatura de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas en el IP de cada sistema, entre temperaturas de almacenamiento. Letras mayúsculas subrayadas distintas en la misma columna indican diferencias significativas en el  $\Delta$ IP de cada sistema entre temperaturas de almacenamiento. Las letras A, A y a representan los valores más altos.

A 5°C el IP de las micropartículas no experimentó una variación significativa. Sin embargo, a 37 y 60 °C se incrementó de forma significativa, siendo mayor el cambio a mayor temperatura y con mayor presencia de mucílago (P-M y P-M+MD). Los azúcares y el ácido ascórbico, compuestos presentes en la pulpa de tuna que son substratos de reacciones de pardeamiento (Shinoda *et al.*, 2005; Stintzing *et al.*, 2005) pudieron contribuir a este cambio, además de la oxidación de los polifenoles del mucílago. Carmona *et al.* (2019) reportó un incremento en el IP de 44, en un colorante concentrado de pulpa de tuna almacenado durante 30 días a temperatura ambiente (~ 23 °C); mientras que un polvo liofilizado el IP aumentó 2,2. Estos resultados reafirman que la velocidad de degradación durante el almacenamiento se incrementa por la mayor disponibilidad de agua en el concentrado, lo que podría ocurrir con la presencia de mucílago, como se ha mencionado. La presencia de oxígeno en el almacenamiento de las micropartículas también podría contribuir a la ocurrencia de este pardeamiento, porque promueve la oxidación del ácido ascórbico y los polifenoles (Piga *et al.*, 2003; Shinoda *et al.*, 2005; Fang y Bhandari, 2010), aunque el oxígeno tiene una

influencia marginal en la degradación de las betalaínas (Sáenz *et al.*, 2012). Por tal motivo, el uso de atmósferas modificadas con baja concentración de oxígeno junto con bajas temperaturas de almacenamiento podría reducir o eliminar la aparición de estas reacciones de degradación y el pardeamiento observado, permitiendo el uso de las micropartículas como colorantes alimentarios después de ser almacenadas.

El cambio total de color de las micropartículas ( $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento a las tres temperaturas estudiadas está representado en la Figura 19. En este gráfico, las letras mayúsculas distintas entre sistemas representan diferencias significativas, por días y las letras minúsculas distintas entre días representan diferencias significativas, por sistemas. Las letras A y a representan los valores más altos.

Se encontró que, al igual que con la retención de indicaxantina, la disminución de la temperatura de almacenamiento redujo la variación de este parámetro. Al final de las 7 semanas a 5 °C la variación total del color en los tres sistemas fue menor a 2. Mientras que a 37 °C el  $\Delta E^*$  fue de 3,9 en P-MD, de 11,6 en P-M+MD y de 16,5 en P-M. En tanto, a 60 °C se calculó un  $\Delta E^*$  de 9,9 en P-MD, de 17,8 en P-M+MD y de 20,9 en P-M. De acuerdo con Obón *et al.* (2009) una diferencia de color de 0 a 1,5 se considera pequeña o no perceptible, mientras que estas serían claramente evidentes con un  $\Delta E^*$  mayor a 5. El  $\Delta E^*$  y el IP observados podrían estar estrechamente relacionados y serían consecuencia del oscurecimiento que pudo producirse, en lugar de ser resultado de la degradación de la indicaxantina. En micropartículas de indicaxantina purificada encapsulada con MD almacenadas a 20 °C durante 6 meses, Gandía-Herrero *et al.* (2010) reportó un  $\Delta E^*$  de 0,93, el cual fue más bajo que el obtenido en el presente estudio. Mientras que en un extracto de betalaínas de betarraga encapsulado con mezclas de MD y almidón modificado almacenadas a 25 °C por 98 días, Zuanon *et al.* (2019) reportó un  $\Delta E^*$  entre 3 y 12,5.

La temperatura de transición vítrea de las micropartículas ( $T_g$ ) es un factor que pudo influir en las diferencias observadas en la estabilidad de la indicaxantina y del color, en las diferentes temperaturas de almacenamiento y en los tres sistemas. La  $T_g$  ha sido relacionada con la estabilidad durante el almacenamiento, recomendándose el empleo de temperaturas de almacenamiento por debajo del valor de la  $T_g$  (Cai y Corke, 2000). Bajo la  $T_g$ , las micropartículas se encuentran en un estado vítreo donde hay un menor movimiento de moléculas, y las reacciones controladas por difusión están inhibidas. En este estado físico el agua estaría esencialmente “inmovilizada” o no disponible para las reacciones de degradación típicas, lo que aseguraría la estabilidad de los compuestos (Slade y Levine, 1991). Sin embargo, algunos autores han demostrado que reacciones como el pardeamiento no enzimático y la oxidación lipídica, pueden ocurrir incluso en el estado vítreo (Tonon *et al.*, 2010).

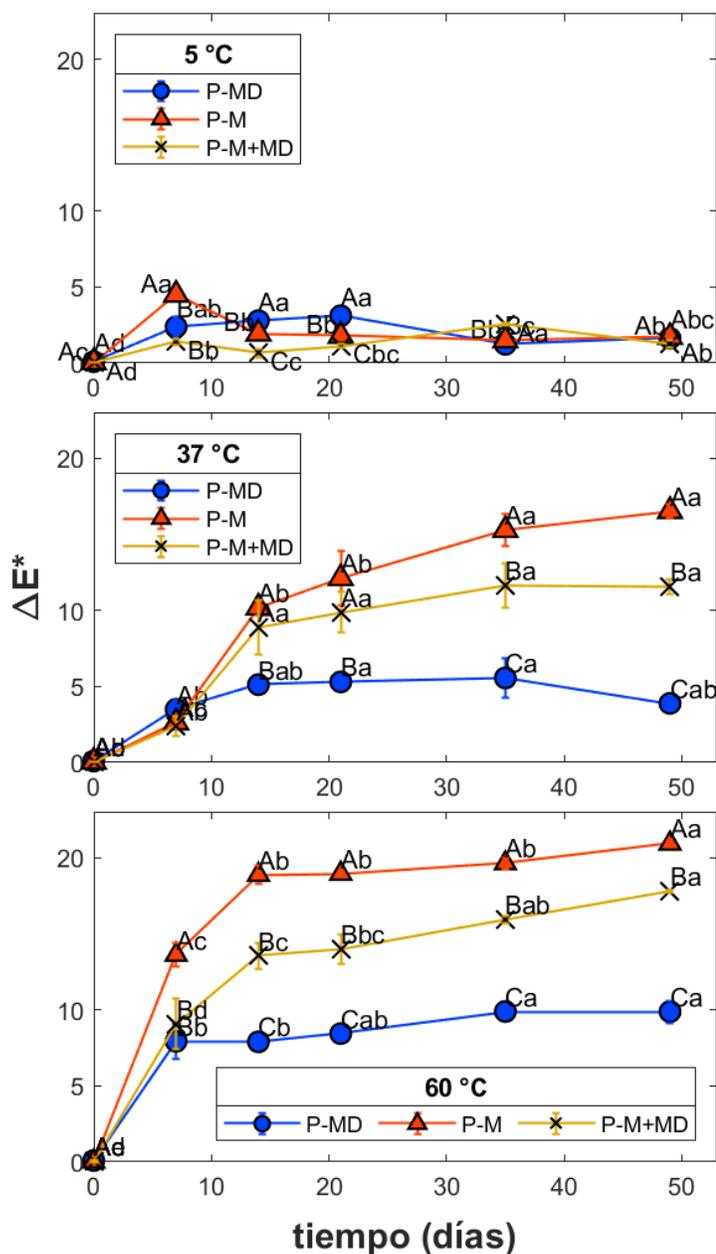


Figura 19. Variación del color ( $\Delta E^*$ ) de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas durante el almacenamiento a 5, 37 y 60 °C.

Considerando que la  $T_g$  de las micropartículas fue de 40 °C, las micropartículas almacenadas a 60 °C se encontraban en un estado gomoso, lo que favorece la degradación de la indicaxantina al incrementarse la movilidad molecular, acelerándose las reacciones de deterioro. Considerando que la transición vítrea ocurre sobre un rango de temperatura y no sobre un valor específico (Tonon *et al.*, 2010), las micropartículas almacenadas a 37 °C, podrían estar en transición entre el estado vítreo y el gomoso, particularmente las de P-M donde se observó

aglomeración. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos para Tg y los reportados en la literatura, los polvos deberían conservarse a temperaturas entre 20 – 25 °C para reducir la degradación de los pigmentos, incrementar la estabilidad de las micropartículas y prolongar el tiempo de almacenamiento. Estas condiciones, junto con el uso de atmósferas con baja concentración de oxígeno permitirían el uso de las micropartículas como colorantes, incluso después de haber sido almacenadas durante un largo período.

### 3.6. Estabilidad del color y los pigmentos en modelos de alimentos

Las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD se aplicaron como un ingrediente colorante en dos modelos de alimentos, un yogur natural sin azúcar adquirido del comercio local (Y-P-MD y Y-P-M+MD) y una bebida refrescante preparada en el laboratorio (B-P-MD y B-P-M+MD) (Obón *et al.*, 2009), siguiendo en ambos la retención de la indicaxantina y el cambio en el color durante 28 días de almacenamiento a 5 °C.

Para determinar el color deseado y la cantidad de micropartículas a adicionar en cada alimento, se midieron los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) de tres yogures comerciales de vainilla y tres aguas saborizadas de pera. Estos datos se compararon con el color de los alimentos preparados en el laboratorio al agregar 0,3 g 100 mL<sup>-1</sup> de micropartículas a la bebida y 0,5 g 100 g<sup>-1</sup> al yogur natural (Figura 20). La selección de los productos patrones (un yogur y un agua saborizada) se realizó de acuerdo con el menor  $\Delta E^*$  y están indicados con el símbolo †. Los productos patrones y con micropartículas se almacenaron en iguales condiciones (5 ± 2 °C, 28 días) para comparar la estabilidad del color.

Respecto a las cantidades añadidas de pigmento, no existen restricciones legales específicas para el empleo de este tipo de colorantes naturales, como es el caso de la betanina de betarraga, y las legislaciones de Estados Unidos, Europa y Chile lo condicionan a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) (EC, 2011; MINSAL, 2019; FDA, 2020), por lo que la cantidad de micropartículas colorantes se podrían emplear sin problemas. Otros autores han agregado cantidades mayores de colorantes a partir de betalaínas (0,7 – 7,5 g 100 g<sup>-1</sup>) respecto a las utilizadas en este estudio (Sáenz *et al.*, 2015; Ruiz-Gutiérrez *et al.*, 2017; Fernández-López *et al.*, 2018; Vargas-Campos *et al.*, 2018; Carmona *et al.*, 2019).

Sin embargo, colorantes sintéticos como la tartrazina y el amarillo crepúsculo y colorantes naturales como el annato y la curcumina sí tienen restricciones en algunas legislaciones, permitiendo cantidades menores a las empleadas en este estudio. Dentro de los colorantes sintéticos, la tartrazina (E102) y el amarillo crepúsculo (E110) tienen límites de 0,01 g 100 g<sup>-1</sup> para la mayoría de los

productos en Europa (EC, 2011) y el *Codex Alimentarius* recomienda su uso hasta un máximo de  $0,03 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en productos lácteos y de  $0,005 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en sopas y caldos (Codex, 2019). Dentro de los colorantes naturales, el annato (E106b) está permitido hasta  $0,001 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en productos lácteos fermentados, licores y otras bebidas con menos de 15% de alcohol y la curcumina (E100ii) se puede emplear hasta  $0,015 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en productos lácteos fermentados y hasta  $0,02 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en licores y otras bebidas con menos de 15% de alcohol en Europa (EC, 2011). Mientras que la recomendación del *Codex* para el empleo de annato y curcumina en bebidas lácteas es de hasta  $0,002 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  y  $0,015 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente (Codex, 2019).

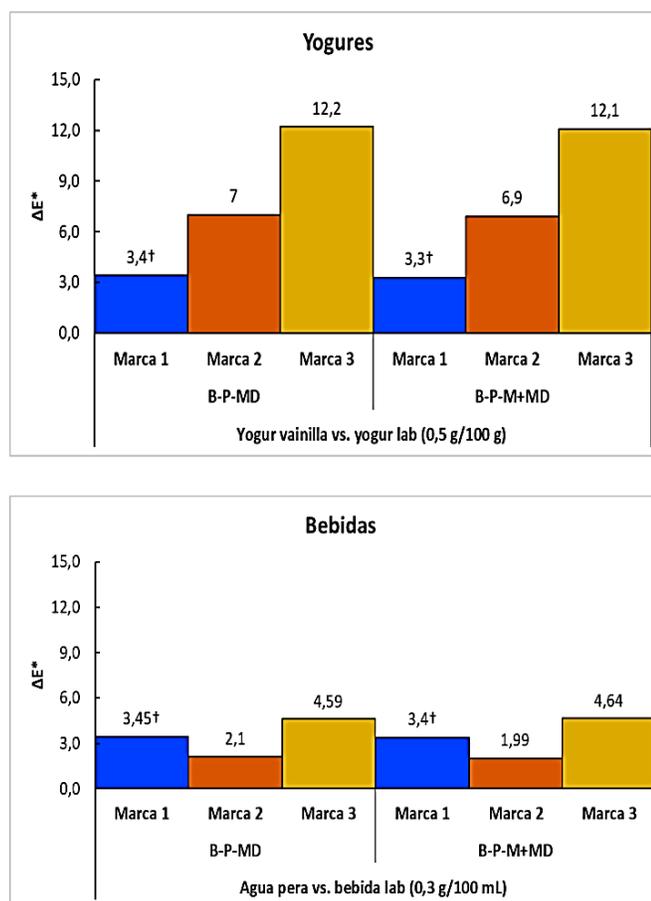


Figura 20. Diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) de los yogures de vainilla y las aguas saborizadas de pera adquiridos del comercio local con los yogures y las bebidas refrescantes con la adición de micropartículas de P-MD y P-M+MD, respectivamente.

En la Figura 21 se muestra la retención de la indicaxantina en las bebidas y yogures con micropartículas P-MD y P-M+MD durante el almacenamiento en

refrigeración a 5 °C. En este gráfico, las letras mayúsculas distintas entre sistemas representan diferencias significativas, por días y las letras minúsculas distintas entre días representan diferencias significativas, por sistemas. Las letras A y a representan los valores más altos.

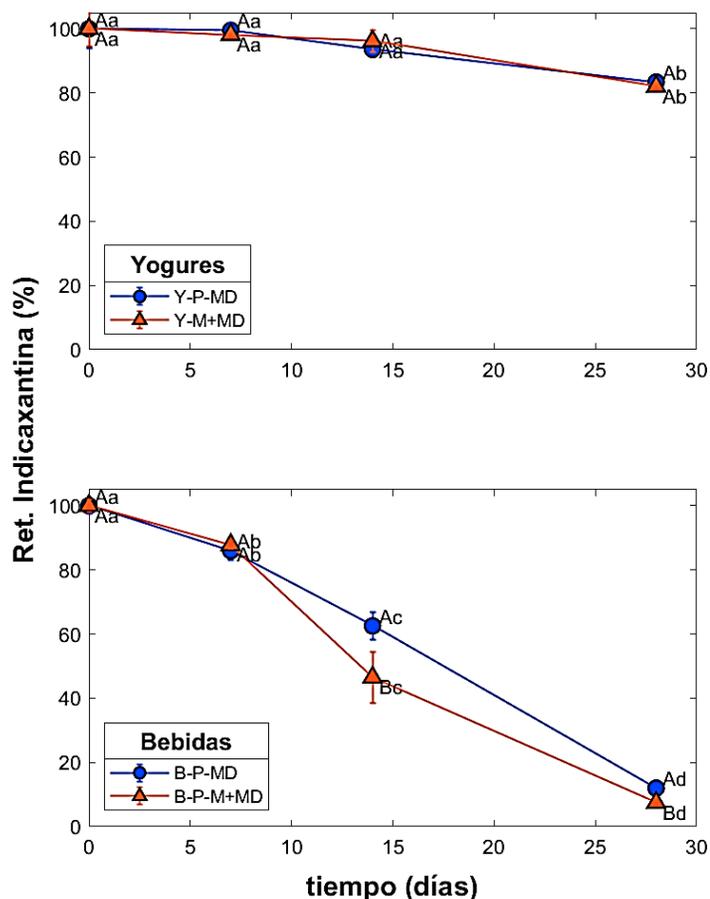


Figura 21. Porcentaje de retención de indicaxantina de los yogures y las bebidas refrescantes coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD, almacenadas durante 28 días a  $5 \pm 2$  °C.

En el yogur el contenido de indicaxantina se mantuvo sin cambios significativos durante las dos primeras semanas, disminuyendo la retención de indicaxantina hasta 83,4% y 82,0% en Y-P-MD y Y-P-M+MD, al final del almacenamiento. Mientras que, en las bebidas la indicaxantina mostró una menor estabilidad que en el yogur, disminuyendo significativamente hasta un 12% y 7,4% al final del almacenamiento, en B-P-MD y B-P-M+MD, respectivamente. Similarmente, Fernández-López *et al.* (2018) reportaron una retención de indicaxantina mayor en yogur (95%) que en una bebida (90%), con micropartículas de extracto de pulpa de tuna anaranjada, almacenados durante 28 días en refrigeración (4 °C).

Las retención de indicaxantina reportadas por Fernández-López *et al.* (2018) fueron mayores a las encontradas en el presente estudio, lo que se debería al mayor contenido en indicaxantina en el extracto inicial ( $27,5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) y a la mayor cantidad de colorante ( $1,5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) adicionado. Mientras que, en el presente estudio se empleó pulpa con concentración de indicaxantina de  $8,0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  y se adicionó  $0,3$  y  $0,5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  de micropartículas. La concentración de betalaínas presentes en una matriz ejerce un papel determinante en su estabilidad, por lo que un mayor contenido inicial incrementaría la estabilidad de los pigmentos en el tiempo (Khan, 2016; Martins *et al.*, 2017), ya que la degradación de las betalaínas sigue una cinética de primer orden, donde la velocidad depende de la concentración inicial del pigmento (Coskuner *et al.*, 2000; Fernández-López *et al.*, 2012).

De igual manera, en los parámetros de color ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$ ) se observó mayor cambio en las bebidas que en los yogures (Figura 22), durante los 28 días en refrigeración. Las variaciones totales  $\Delta L^*$ ,  $\Delta C^*$  y  $\Delta h^\circ$ , entre el inicio y el final del almacenamiento de los alimentos a  $5^\circ \text{C}$  están representadas en la Figura 23. En este gráfico, las letras distintas representan diferencias significativas entre sistemas en cada parámetro y la letra a representa el valor más alto.

Respecto al valor de  $L^*$ , en los yogures hubo un leve aumento de 0,2 en Y-P-MD, de 0,4 en Y-P-M+MD, sin diferencias significativas entre estos sistemas; mientras que en Y-Comercial no hubo cambio en  $L^*$ . Asimismo, en las bebidas hubo un aumento de la luminosidad de 2,4 en B-P-MD y B-P-M+MD, que fue significativamente mayor, respecto a la B-comercial, donde  $L^*$  disminuyó 0,8. Estas variaciones se reflejaron en las bebidas con micropartículas, volviéndose más pálidas, a diferencia de la bebida con los colorantes sintéticos, en la cual el aumento de  $L^*$  fue pequeño y no se observó una variación perceptible (Figura 24), con lo que se reafirman la mayor estabilidad de los colorantes sintéticos por sobre los naturales, en bebidas de fantasía.

En cuanto a la croma ( $C^*$ ), en los yogures se observó un incremento de 0,8 en Y-Comercial, que fue significativamente mayor al incremento de 0,2 en Y-P-MD y a la disminución de 0,04 en Y-P-M+MD. En las bebidas, las variaciones de  $C^*$  fueron mayores, con disminuciones de 5,1 en B-P-MD y de 4,9 en B-P-M+MD, lo que significó un descenso en la intensidad del color (Obón *et al.*, 2009). En B-Comercial, hubo un incremento de  $C^*$  de 0,1. Estos cambios en las bebidas, principalmente, significaron que se volvieron más claras durante el almacenamiento, como consecuencia de la pérdida de indicaxantina (Figura 24).

En relación al ángulo de tono ( $h^\circ$ ), en los yogures hubo un aumento de 2,4 en Y-P-MD y de 1,7 en Y-P-M+MD, mientras que en Y-Comercial hubo una disminución de 0,8; indicando que no ocurrió un cambio del ángulo apreciable, por lo que la tonalidad del color se mantuvo prácticamente constante en el tiempo (Obón *et al.*, 2009). Por otro lado, en las bebidas el cambio en  $h^\circ$  fue mayor, con

incrementos significativos en B-P-MD y en B-P-M+MD, de 8,9, y 7,5 que indican un movimiento de la tonalidad de las bebidas, acercándose a la zona de color verde y alejándose de los tonos amarillo-anaranjados (Anexo XIX), lo que unido a los cambios en los parámetros  $C^*$  y  $L^*$ , provocaron una pérdida del color apreciable (Figura 24). Mientras que, en B-Comercial la variación fue solamente de 0,2, debido a la ya mencionada alta estabilidad de los colorantes sintéticos.

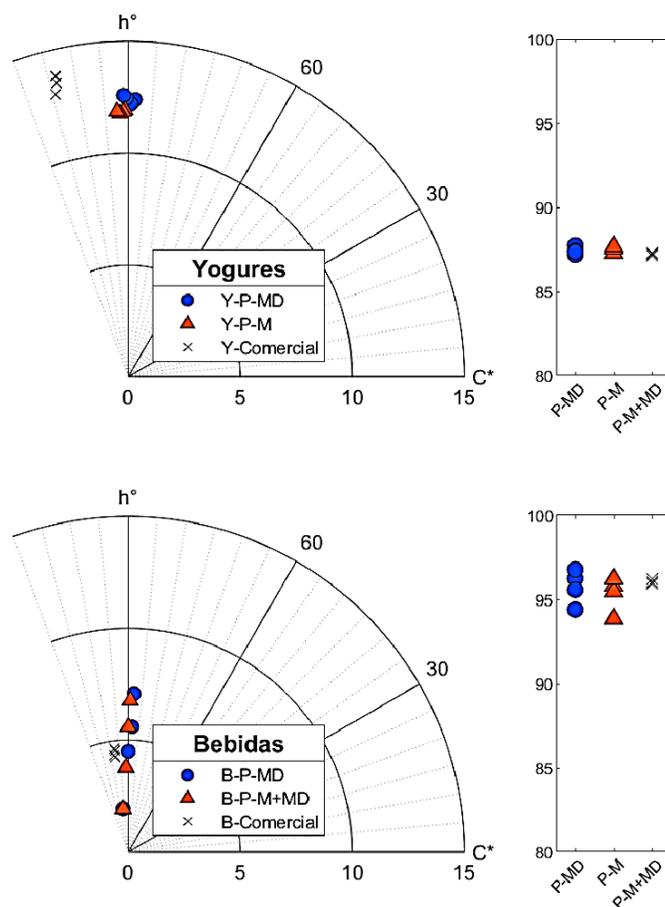


Figura 22. Cambio en los parámetros  $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$  de los yogures y las bebidas refrescantes coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD y los productos comerciales, almacenadas durante 28 días a 5 °C.

En términos generales, el color de los yogures no sufrió cambios durante el almacenamiento, mientras que la intensidad del color de las bebidas coloreadas con las micropartículas disminuyó, haciéndose más pálidas y claras, debido a la degradación de la indicaxantina (Obón *et al.*, 2009). Aunque el colorante sintético no experimentó cambios notables, el uso de colorantes naturales como estas micropartículas amarillas para formular bebidas refrescantes u otros alimentos que son consumidos especialmente por niños permitiría aumentar las

expectativas de los consumidores de alimentos más limpios, considerados seguros y no perjudiciales para la salud.

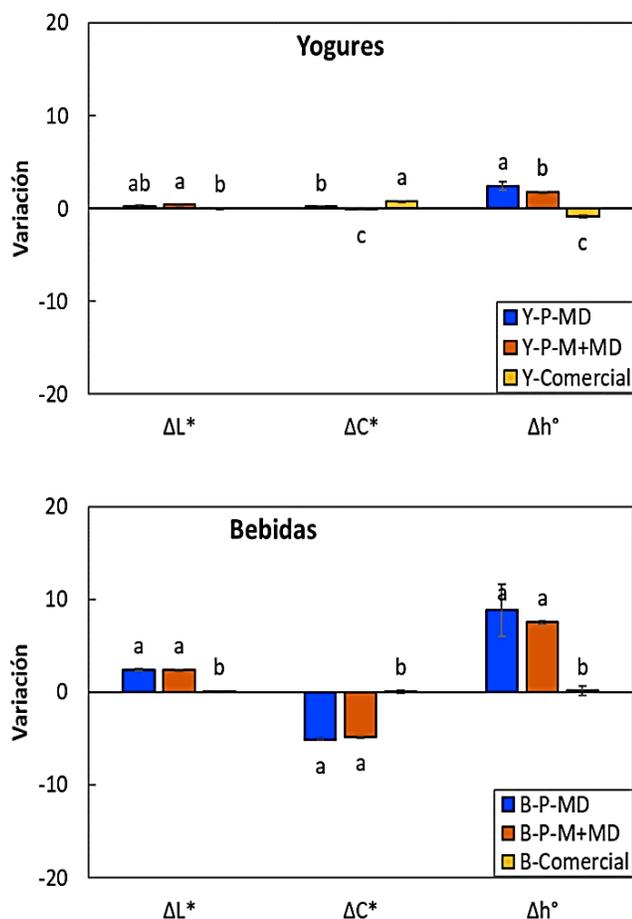


Figura 23. Variación de los parámetros de color ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta C^*$  y  $\Delta h^\circ$ ) entre el inicio y el fin del almacenamiento a 5 °C de los yogures y las bebidas refrescantes coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD y los productos comerciales.

Fernández-López *et al.* (2018) reportaron en el yogur con micropartículas de pulpa amarilla de tuna con MD, una reducción de  $C^*$  (0,7),  $L^*$  (0,3) y  $h^\circ$  (1,63), que en general fueron pequeñas, al igual que en el presente estudio. En la bebida los autores reportaron un incremento de  $C^*$  (0,34) y reducción de  $L^*$  (2,3) y  $h^\circ$  (1,3), menores a las obtenidas en el presente estudio, que podrían estar relacionadas al efecto de la concentración de pigmentos, discutido más arriba.

En yogures coloreados con emulsiones dobles de extracto de pulpa rojo-púrpura de *Opuntia oligacantha* en concentraciones de 10%, 20% y 30%, se observaron variaciones de  $L^*$  entre -6,6 y 10,3 durante 36 días a 4 °C; mientras que la

componente  $a^*$  varió entre -0,1 y -0,4 y la  $b^*$  entre 2,0 y 0,95, respectivamente (). Por otra parte, Obón *et al.* (2009) reportaron en yogures no endulzados, coloreados con polvos de color rojo-púrpura de *Opuntia stricta*, durante un mes de almacenamiento, un incremento de  $h^\circ$  de 5,7, con un cambio en la tonalidad del púrpura al rojo; una reducción de  $C^*$  de 3,9 y un incremento en  $L^*$  de 1,1, que indicaron una caída de la intensidad del color y aumento de la luminosidad. En un segundo modelo de alimento (bebida refrescante), los mismos autores (Obón *et al.*, 2009) no observaron cambios en la tonalidad ( $h^\circ$ ); mientras que en  $C^*$  hubo una disminución de 4,5 y en  $L^*$  un incremento de 2,2 que resultan similares a los obtenidos en el presente estudio.

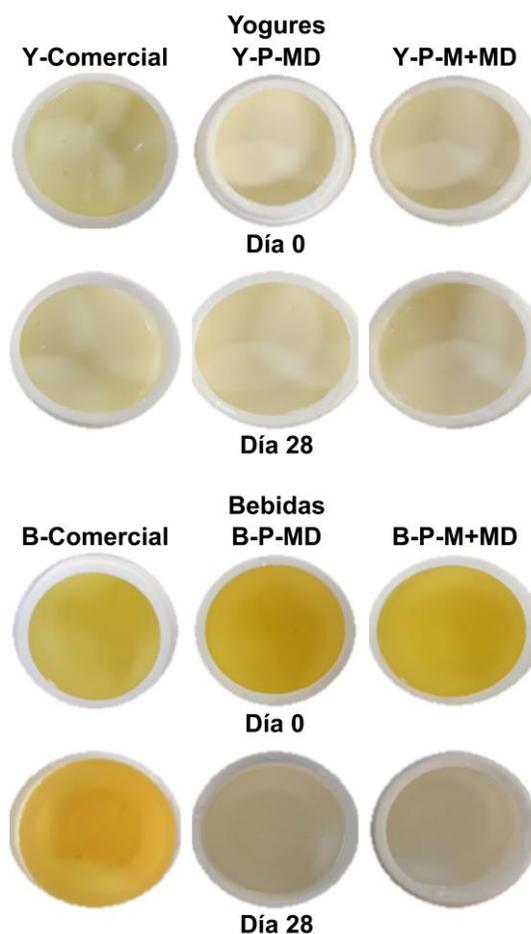


Figura 24. Fotografías de los yogures y las bebidas refrescantes al inicio y final del almacenamiento a  $5 \pm 2$  °C.

El cambio total de color de los yogures y las bebidas refrescantes con micropartículas P-MD y P-M+MD durante el almacenamiento en refrigeración está representado en la Figura 25. En este gráfico las letras mayúsculas distintas

entre sistemas representan diferencias significativas, por días y las letras minúsculas distintas entre días representan diferencias significativas, por sistemas. Las letras A y a representan los valores más altos.

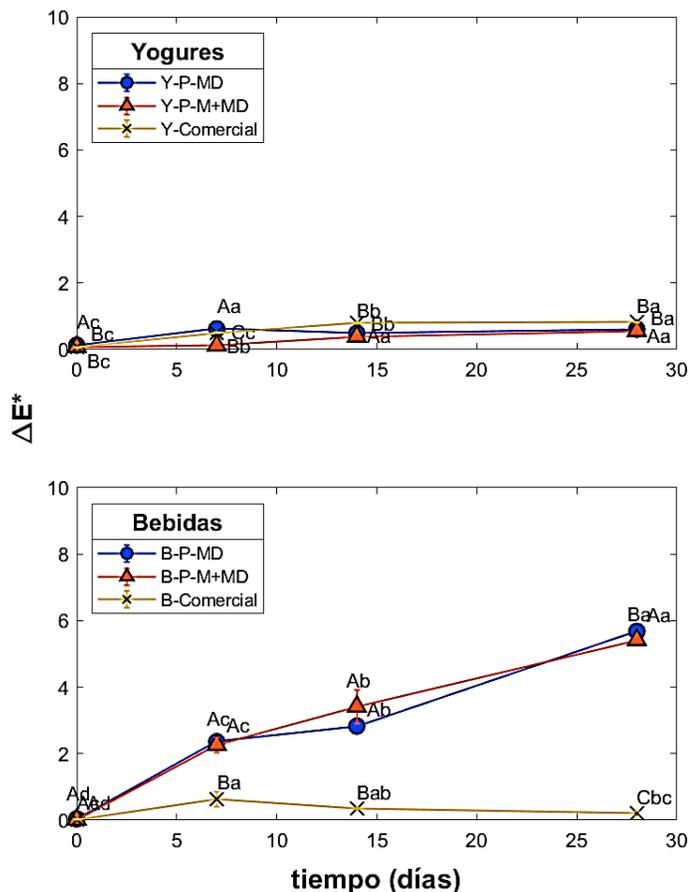


Figura 25. Variación del color ( $\Delta E^*$ ) de los yogures y las bebidas refrescantes coloreadas con las micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD y los productos comerciales, almacenadas durante 28 días a 5 °C.

En la Figura 25 se observa que, al igual que con la retención de indicaxantina, el color del yogur se mantuvo estable durante los 28 días. Al final del almacenamiento el  $\Delta E^*$  en los yogures fue de 0,61, 0,56 y 0,82 para Y-P-MD, Y-P-M+MD y Y-Comercial, respectivamente, el cual fue prácticamente imperceptible (Cserhalmi *et al.*, 2006; Mokrzycki y Tatol, 2011) y mostró una estabilidad similar en los tres productos. Mientras que, en las bebidas el  $\Delta E^*$  fue de 5,68, 5,42 y 0,20 para B-P-MD, B-P-M+MD y B-Comercial, respectivamente. Por tanto, como era de esperar, la bebida comercial con colorante sintético fue más estable. En este contexto, la alta estabilidad de los colorantes sintéticos es una de las razones por las que se siguen empleando a pesar de sus implicaciones

en la salud (Rymbai *et al.*, 2011; Kobylewski y Jacobson, 2012). En cualquier caso y dado que el  $\Delta E^*$  estuvo cercano a 5, que es el límite para un cambio visual evidente, perceptible para los ojos no expertos (Obón *et al.*, 2009), el uso de una concentración inicial de micropartículas más alta resolvería este problema. Además, el empleo de las micropartículas en la formulación de alimentos instantáneos en polvo, que se consumen después de su preparación, parece ser otra alternativa de uso viable.

Fernández-López *et al.* (2018) empleando micropartículas de extracto de pulpa amarilla de tuna con MD reportaron un cambio de color similar en yogur (0,95); mientras que en una bebida el  $\Delta E^*$  fue de 2,35. En otros estudios, Carmona *et al.* (2019) reportaron un mayor  $\Delta E^*$  (15,7) en bebidas preparadas con pulpa de tuna anaranjada liofilizada, después de 30 días en almacenamiento a 4 °C en oscuridad y Sáenz *et al.* (2015) obtuvieron valores de  $\Delta E^*$  entre 30,9 y 53,1 en bebidas coloreadas con micropartículas de pulpa y extractos ultrafiltrados de tuna púrpura, almacenados en condiciones similares, de acuerdo con la menor estabilidad de la betanina respecto a indicaxantina.

La mayor estabilidad de la indicaxantina y el color observada en los yogures, respecto a las bebidas, puede ser atribuida a la diferencia entre las matrices (semigrasa vs. acuosa). En el yogur existe una menor posibilidad de movilidad de los componentes hidrosolubles como la indicaxantina (Fernández-López y Almela, 2001; Fernández-López *et al.*, 2012; Khan, 2016) y por tanto una menor posibilidad de reacciones de degradación, en comparación con la matriz acuosa. Una vez que las micropartículas son agregadas a las bebidas, la mayor parte de las betalaínas se liberan por la alta solubilidad de las micropartículas (> 90%), perdiendo su protección (Sáenz *et al.*, 2015).

Por otra parte, el pH de las matrices también influiría en estos resultados. El pH del yogur permaneció constante durante el almacenamiento, en los tres sistemas (4,2 – 4,3). Mientras que el pH de las bebidas B-P-MD y B-P-M+MD disminuyó desde un valor inicial de 3,0 hasta 2,7 el día 28 y el pH de B-Comercial se mantuvo entre 3,6 – 3,4. Este es uno de los factores que afecta la estabilidad de las betaxantinas, el más importante descrito después de la temperatura (Herbach *et al.*, 2006; Khan, 2016). La indicaxantina tiene cierta estabilidad a pH entre 4 y 7, siendo más estable a pH = 5,5, cercano al pH natural de la fruta (Cai *et al.*, 2001; Herbach *et al.*, 2006). Bajo pH = 3, con condiciones ácidas, se produce la hidrólisis de la indicaxantina (Stintzing *et al.*, 2002), que produciría un ligero incremento del ácido betalámico de color amarillo pálido (aproximadamente 1% de la cantidad inicial de betaxantina), el cual es inestable y se degrada fácilmente, con pérdida total del color (Gandía-Herrero *et al.*, 2010).

### 3.6.1. Cinética de degradación de la indicaxantina en las bebidas

La degradación de la indicaxantina en la pulpa amarillo-anaranjada de *O. ficus-indica*, siguió una cinética de pseudo-primer orden, similar a lo reportado (Coskuner *et al.*, 2000; Sáenz *et al.*, 2009; Fernández-López *et al.*, 2012; Sáenz *et al.*, 2015; Carmona *et al.*, 2019). Por tanto, las constantes de velocidad de degradación ( $k_{obs.}$ ) en las bebidas se obtuvieron a partir de las pendientes de los gráficos del logaritmo natural del porcentaje de retención de indicaxantina vs. el tiempo de almacenamiento (Figura 26).

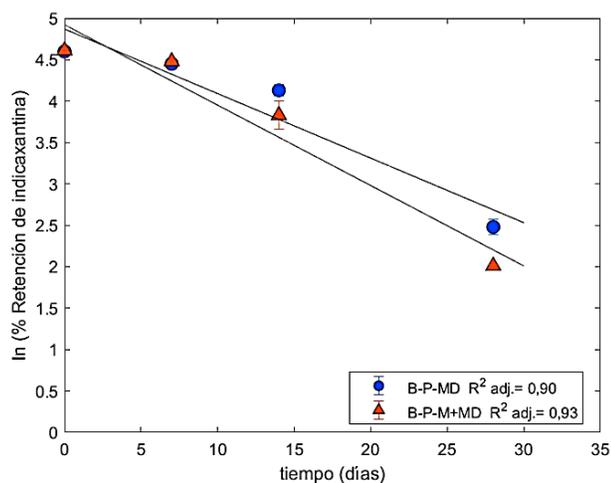


Figura 26. Logaritmo natural del porcentaje de retención de indicaxantina vs. el tiempo de almacenamiento en refrigeración, de las bebidas refrescantes coloreadas con micropartículas de los sistemas P-MD y P-M+MD.

En la Tabla 11 se muestran las constantes de velocidad de degradación de las bebidas B-P-MD y B-P-M+MD durante el almacenamiento a  $5 \pm 2$  °C. En los yogures no se determinaron las constantes porque al final del almacenamiento la retención se mantuvo sobre el 50%.

Tabla 11. Constantes de velocidad de degradación de las betaxantinas en las bebidas refrescantes almacenadas a 5 °C

Bebida refrescante	$k_{obs.}$ (días <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup> ajustado (g.l.)
B-P-MD	$7,8 \times 10^{-2} \pm 4,0 \times 10^{-3}$ (b)	0,90
B-P-M+MD	$9,7 \times 10^{-2} \pm 6,0 \times 10^{-4}$ (a)	0,93

B: bebida; P-MD: micropartículas de pulpa de tuna con maltodextrina; P-M+MD: micropartículas de pulpa de tuna con mezcla mucílago-maltodextrina; g.l.: grados de libertad; letras diferentes muestras diferencias significativas y la letra a representa el valor más alto.

La constante de degradación en la bebida B-P-M+MD fue mayor, indicando que B-P-MD fue levemente más estable durante el almacenamiento refrigerado. Sáenz *et al.* (2015) reportaron menores constantes de degradación de indicaxantinas ( $1,6 - 2,3$ ;  $2,4 - 2,6$  y  $3,0 - 3,2$ )  $\times 10^{-2}$  días<sup>-1</sup>, en bebidas de fantasía coloreadas con micropartículas de pulpa de tuna púrpura, extracto ultrafiltrado y nanofiltrado, respectivamente, encapsulados con dos almidones modificados. Estos resultados evidenciaron que aun cuando se esperaría un comportamiento similar en todos los sistemas, la velocidad de degradación de los pigmentos se ve afectada tanto por la matriz en que se encuentra como por el tipo de agente encapsulante. Carmona *et al.* (2019) reportaron mayores constantes de velocidad de degradación ( $2,0 \times 10^{-1}$  días<sup>-1</sup>) en bebidas modelo con colorantes liofilizados de tuna anaranjada, lo que indica que los pigmentos quedaron sin ninguna protección una vez disueltos y que los agentes encapsulantes de las micropartículas obtenidas por secado por atomización le confieren cierta protección aun después de que estas se disuelvan en el agua.

## CONCLUSIONES

- I. En la microencapsulación por secado por atomización de la pulpa de tuna anaranjada (*Opuntia ficus-indica*) la temperatura de secado y la relación pulpa/agente encapsulante tuvieron un efecto significativo sobre la EE de indicaxantina y el rendimiento del proceso.
- II. Los agentes encapsulantes utilizados para la obtención de micropartículas de pulpa de tuna anaranjada, maltodextrina (MD), mucílago (M) y mezcla de mucílago-maltodextrina (M+MD) afectan las características de estas, así como la estabilidad de la indicaxantina. La maltodextrina y la mezcla mucílago-maltodextrina encapsularon una gran cantidad de pigmento (más del 90%), manteniendo su estabilidad y conservando el color durante el almacenamiento, mostrando una alta interacción pigmento-maltodextrina.
- III. Las condiciones óptimas para la encapsulación con MD (temperatura del aire de entrada: 150 °C y relación P/AE 3:1) muestran que la relación pulpa/agente encapsulante tiene más influencia que la temperatura en el rendimiento durante la encapsulación.
- IV. La retención de indicaxantina durante el almacenamiento es alta en todos los sistemas de micropartículas estudiados, sin embargo, se observa que a 60 °C el mucílago, al aumentar la higroscopicidad de las partículas contribuye a la degradación de los pigmentos, probablemente por una reacción de hidrólisis.
- V. Las micropartículas con maltodextrina (P-MD y P-M+MD) muestran un comportamiento similar como colorantes en un yogur y en una bebida

refrescante, siendo más estables en el yogur, debido posiblemente a una menor liberación en esa matriz que en agua.

- VI. El color del yogur con micropartículas (P-MD y P-M+MD) muestra similar estabilidad que el color del yogur con colorante natural comercial, siendo esto un punto favorable para su potencial comercial, cumpliéndose la hipótesis planteada al respecto.
  
- VII. En los sistemas de micropartículas P-MD y P-M+MD se cumple la hipótesis que plantea que la eficiencia de encapsulación y estabilidad de indicaxantina serían similares, aun empleando agentes encapsulantes distintos.
  
- VIII. Por lo tanto, el mucílago de nopal con adición parcial de maltodextrina, puede ser un agente encapsulante de la pulpa de tuna anaranjada, proporcionando un colorante amarillo-anaranjado natural para alimentos, dando, además, una nueva alternativa de utilización a una planta de bajo requerimiento hídrico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cenobio-Galindo *et al.*, 2019A.C.S. 2018. *Maltodextrin* [Online]. American Chemical Society. Disponible en: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/m/maltodextrin.html> [Visitado 09-06-2020].
- Alfaro, F. 2013. *Estabilidad de betalaínas en yogurt adicionado con micropartículas de pulpa o ultrafiltrado de tuna púrpura (Opuntia ficus-indica)*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Agroindustrial, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago. Chile.
- Allai, L., Karym, E. M., El Amiri, B., Nasser, B., Essamad, A., Terzioglu, P., Ertas, A. y Ozturk, M. 2017. Evaluation of antioxidant activity and phenolic composition of *Opuntia ficus-indica* cladodes collected from Moroccan Settat region. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12(1), 105-117.
- Allegra, A., Sortino, G., Inglese, P., Settanni, L., Todaro, A. y Gallotta, A. 2017. The effectiveness of *Opuntia ficus-indica* mucilage edible coating on post-harvest maintenance of 'Dottato' fig (*Ficus carica* L.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 135-141.
- Almeida, M. B., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. y Escaleira, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Amin, K. A., Hameid, H. A. y Abd Elsttar, A. H. 2010. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994-2999.
- AOAC 1990. *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists*, Fifteenth ed., Arlington, Virginia, United States: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., Santos-Díaz, M. D., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L.

- y de la Rosa, A. P. B. 2015. Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 119-130.
- Azeredo, H. M. C. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2365-2376.
- Baca, L. F. G. y Boyas, E. A. 2019. Earthen plasters stabilized with prickly pear cactus. *Nodo*, 14(27), 53-62.
- Badui, D. S. 2006. *Química de los alimentos*, Cuarta ed., Naucalpan de Juárez, Edo. de México. México: Pearson Educación de México, S.A. de C.V.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A. y Liang, L. 2016. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143-182.
- Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A. y Robledo, C. W. 2008. Infostat. Manual del usuario. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Barba, F. J., Garcia, C., Fessard, A., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Aboudia, A., Ouadia, A. y Remize, F. 2020. *Opuntia ficus-indica* edible parts: a food and nutritional security perspective. *Food Reviews International*, 1-23.
- Bargougui, A., Tag, H. M., Bouaziz, M. y Triki, S. 2019. Antimicrobial, antioxidant, total phenols and flavonoids content of four cactus (*Opuntia ficus-indica*) cultivars. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1353-1368.
- Barrows, J. N., Lipman, A. L. y Belai, N. 2014. History of U.S. regulation of color additives and colorants. *Food Additives and Packaging*. American Chemical Society.
- Bayar, N., Kriaa, M. y Kammoun, R. 2016. Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 441-450.
- Bhatia, M. S. 1996. Allergy to tartrazine in alprazolam. *Indian Journal of Medical Science*, 50(8), 285-286.
- Bhatia, M. S. 2000. Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. *Journal of Clinical Psychiatry*, 61(7), 473-476.

- Bourrier, T. 2006. Intolérances et allergies aux colorants et additifs. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46(2), 68-79.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R. y Livrea, M. A. 2002. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6895-6901.
- Cai, Y. y Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65(7), 1248-1252.
- Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W. y Corke, H. 2001. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4429-4435.
- 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.
- Carareto, N. D. D., Monteiro, E. S., Pessoa, P. A. y Meirelles, A. J. A. 2010. Water activity of aqueous solutions of ethylene oxide-propylene block copolymers and maltodextrins. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1), 173-181.
- Cárdenas, A., Argüelles, W. M. y Goycoolea, F. M. 1998. On the possible role of *Opuntia ficus-indica* mucilage in lime mortar performance in the protection of historical buildings. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 3(1998), 64-71.
- Carmona, J. C., Fabry, A. M. y Sáenz, C. 2019. Coloring foods from yellow-orange cactus pear. *Acta Horticulturae*, 1247, 15-22.
- Cenobio-Galindo, A. D., Díaz-Monroy, G., Medina-Pérez, G., Franco-Fernández, M. J., Ludena-Urquizo, F. E., Vieyra-Alberto, R. y Campos-Montiel, R. G. 2019. Multiple emulsions with extracts of cactus pear added in a yogurt: antioxidant activity, in vitro simulated digestion and shelf life. *Foods*, 8(10), 12.
- Chauhan, S. P., Sheth, N. R., Jivani, N. P., Rathod, I. S. y Shah, P. I. 2010. Biological actions of *Opuntia* species. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(2), 146-151.

- Chong, S. Y. y Wong, C. W. 2015. Production of spray-dried sapodilla (*Manilkara zapota*) powder from enzyme-aided liquefied puree. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2604-2611.
- Chougui, N., Tamendjari, A., Hamidj, W., Hallal, S., Barras, A., Richard, T. y Larbat, R. 2013. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food Chemistry*, 139(1-4), 796-803.
- Clarke, M. A. 2003. Syrups. In: Caballero, B. (ed.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Second ed. Oxford. Academic Press.
- Codex. 2019. Norma general para los aditivos alimentarios. In: FAO-OMS (ed.) *Codex Stan 192-1995*. Roma, Italy: FAO-OMS.
- Cohen, E. y Saguy, I. 1983. Effect of water activity and moisture-content on the stability of beet powder pigments. *Journal of Food Science*, 48(3), 703-707.
- Collins, P. 2014. New legal framework for coloring foods. *Food Marketing and Technology*, 28(2), 12.
- Contreras-Padilla, M., Gutiérrez-Cortez, E., Valderrama-Bravo, M., Rojas-Molina, I., Espinosa-Arbeláez, D., Suárez-Vargas, R. y Rodríguez-García, M. 2012. Effects of drying process on the physicochemical properties of nopal cladodes at different maturity stages. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 44-49.
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M., Carrillo-Lopez, A. y González-Aguilar, G. 2008. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498-10504.
- Cortés-Camargo, S., Cruz-Olivares, J., Barragán-Huerta, B. E., Dublán-García, O., Román-Guerrero, A. y Pérez-Alonso, C. 2017. Microencapsulation by spray drying of lemon essential oil: Evaluation of mixtures of mesquite gum-nopal mucilage as new wall materials. *Journal of Microencapsulation*, 34(4), 395-407.
- Coskuner, Y., Turker, N., Ekiz, H. I., Aksay, S. y Karababa, E. 2000. Effect of pH and temperature on the thermostability of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) yellow-orange pigments. *Nahrung-Food*, 44(4), 261-263.

- Cota-Sánchez, H. J. 2016. Chapter 28 – Nutritional composition of the prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *In: Simmonds, M. y Preedy, V. (eds.) Nutritional composition of fruit cultivars*. London, UK. Academic Press.
- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, Á., Toth-Markus, M. y Lechner, N. 2006. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1-2), 49-54.
- Damodaran, S. 2017. Water and ice relations in foods. *In: Damodaran, S. y Parkin, K. L. (eds.) Fennema's Food Chemistry*. Fifth ed. Boca Raton, Florida. United States. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Dao, T. G., Nguyen, T. T., Song, X., Wang, X. y Song, K. 2018. The effect of pretreatment method on the decorative effect of the wax furniture. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 452.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. y Bartolomé, B. 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48-54.
- Day, A. 2009. Glucose, liquid. *In: Rowe, R. C., Sheskey, P. J. y Quinn, M. E. (eds.) Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth ed. London, UK, Chicago, USA. Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R. y Paredes-López, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- Desobry, S. A., Netto, F. M. y Labuza, T. P. 1997. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for beta-carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62(6), 1158-1162.
- Dokic, P., Jakovljevic, J. y Dokic-Baucal, L. 1998. Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141(3), 435-440.
- Domínguez, J. M. 2011. Drying. *In: Murray, M. (ed.) Comprehensive Biotechnology*. Second ed. Burlington. Academic Press.
- EC. 2008. Reglamento (CE) 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo sobre aditivos alimentarios. *In: Comisión Europea (ed.) Unión Europea: Diario Oficial de la Unión Europea*.

- EC. 2011. Reglamento (UE) 1129/2011 de la comisión por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. *In: Comisión Europea* (ed.). Unión Europea: Diario Oficial de la Unión Europea.
- EC. 2013. Guidance notes on the classification of food extracts with colouring properties- VERSIÓN 1, in conjunction with Regulation (EC) 1333/2008 on food additives. *In: European Commission* (ed.). European Union.
- EFSA 2009a. Scientific opinion on the re-evaluation of quinoline yellow (E 104) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1329.
- EFSA 2009b. Scientific opinion on the re-evaluation tartrazine (E 102). *The EFSA Journal*, 7(11), 1331.
- EFSA 2014. Reconsideration of the temporary ADI and refined exposure assessment for sunset yellow FCF (E 110). *EFSA Journal*, 12(7), 3765.
- El Gharras, H., Hasib, A., Jaouad, A., El-bouadili, A. y Schoefs, B. 2008. Stability of vacuolar betaxanthin pigments in juices from Moroccan yellow *Opuntia ficus indica* fruits. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(2), 351-356.
- Espinoza, S. K. V. 2002. *Estudio de algunas propiedades físicas de hidrocoloides provenientes de la semilla de algarrobo (Prosopis chilensis (Mol.) Stuntz) y de cladodio del nopal (Opuntia ficus-indica (L.) Mill.)*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias Mención Producción Agroindustrial., Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Everding, H. 2015. CIELAB color space from front. *Own work*. Wikimedia Commons, the free media repository.
- Fang, Z. y Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(10), 510-523.
- Fang, Z. y Bhandari, B. 2012. Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Research International*, 48(2), 478-483.
- Farías-Cervantes, V. S., Chávez-Rodríguez, A., Delgado-Licon, E., Aguilar, J., Medrano-Roldan, H. y Andrade-González, I. 2017. Effect of spray drying of agave fructans, nopal mucilage and aloe vera juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13027.

- FDA. 2020. Electronic code of federal regulation e-CFR. Food and drugs Title 21 - Chapter I - Subchapter A: General - Parts: 70-82. 2020 ed. United States of America: Food and Drug Administration.
- Femenia, A., Lefebvre, A. C., Thebaudin, J. Y., Robertson, J. A. y Bourgeois, C. M. 1997. Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. *Journal of Food Science*, 62(4), 635-639.
- Fernández-López, J. A. y Almela, L. 2001. Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2), 415-420.
- Fernández-López, J. A., Giménez, P. J., Angosto, J. M. y Moreno, J. I. 2012. A process of recovery of a natural yellow colourant from *Opuntia* fruits. *Food Technology and Biotechnology*, 50(2), 246-251.
- Fernández-López, J. A., Roca, M. J., Angosto, J. M. y Obón, J. M. 2018. Betaxanthin-rich extract from cactus pear fruits as yellow water-soluble colorant with potential application in foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 146-153.
- Freers, S. O. 2009. Maltodextrin. In: Rowe, R. C., Sheskey, P. J. y Quinn, M. E. (eds.) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth ed. London, UK, Chicago, USA. Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.
- Galati, E. M., Mondello, M. R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S. y Taviano, M. F. 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4903-4908.
- Galati, E. M., Monforte, M. T., Tripodo, M. M., d'Aquino, A. y Mondello, M. R. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*): ultrastructural study. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), 1-9.
- Galati, E. M., Tripodo, M. M., Trovato, A., Miceli, N. y Monforte, M. T. 2002. Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*) waste matter - Note I: diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 17-21.
- Galdino, P. O., de Figueiredo, R. M. F., Queiroz, A. J. d. M., Galdino, P. O. y Fernandes, T. K. d. S. 2016. Stability of cactus-pear powder during storage. *Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental*, 20(2), 169-173.

- Gambino, G., Allegra, M., Sardo, P., Attanzio, A., Tesoriere, L., Livrea, M. A., Ferraro, G. y Carletti, F. 2018. Brain distribution and modulation of neuronal excitability by indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* administered at nutritionally-relevant amounts. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 1-11.
- Gandía-Herrero, F., Cabanes, J., Escribano, J., García-Carmona, F. y Jiménez-Atienzar, M. 2013. Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18), 4294-4302.
- Gandía-Herrero, F. y García-Carmona, F. 2013. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, 18(6), 334-343.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atienzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F. y Escribano, J. 2010. Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10646-10652.
- García, N. 2017. *Optimización de la extracción acuosa y secado del biopolímero de nopal (Opuntia ficus-indica)*. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
- Giménez, P. J., Fernández-López, J. A., Angosto, J. M. y Obon, J. M. 2015. Comparative thermal degradation patterns of natural yellow colorants used in foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 380-387.
- GrandViewInc. 2017. *Global Natural Food Colors Market Size & Share. Industry Report, 2025* [Online]. @GrandViewInc. Disponible en: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/natural-food-colors-market> [Visitado 10-11-2020].
- Griffiths, J. C. 2005. Coloring foods and beverages. *Food Technology*, 59(5), 38-44.
- Harrabi, B., Athmouni, K., Hamdaoui, L., Ben Mahmoud, L., Hakim, A., El Feki, A., Zeghal, K. y Ghozzi, H. 2017. Polysaccharides extraction from *Opuntia stricta* and their protective effect against HepG2 cell death and hypolipidaemic effects on hyperlipidaemia rats induced by high-fat diet. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 123(4), 225-237.

- Hassan, G. M. 2009. Effects of some synthetic coloring additives on DNA damage and chromosomal aberrations of rats. *Arab Journal of Biotechnology*, 13(1), 13-24.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2006. Betalain stability and degradation - structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71(4), R41-R50.
- Hexaresearch. 2018. *Global Natural Food Colors Market Size, 2014-2025. Industry Report* [Online]. Disponible en: <https://www.hexaresearch.com/research-report/natural-food-colors-market-analysis> [Visitado 20-11-2020].
- Jiménez-Aguilar, D. M., Mujica-Paz, H. y Welti-Chanes, J. 2014. Phytochemical characterization of prickly pear (*Opuntia* spp.) and of its nutritional and functional properties: a review. *Current Nutrition and Food Science*, 10(1), 57-69.
- Kanner, J., Harel, S. y Granit, R. 2001. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178-5185.
- Karaca, A. C., Guzel, O. y Ak, M. M. 2016. Effects of processing conditions and formulation on spray drying of sour cherry juice concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 449-455.
- Kennedy, J. F., Knill, C. J. y Taylor, D. W. 1995. Maltodextrins. In: Kearsley, M. W. y Dziedzic, S. Z. (eds.) *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their derivatives*. Boston, MA. Springer.
- Khan, M. I. 2016. Stabilization of betalains: a review. *Food Chemistry*, 197, 1280-1285.
- Khan, M. I. y Giridhar, P. 2015. Plant betalains: chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267-295.
- Khayyat, L., Essawy, A., Sorour, J. y Soffar, A. 2017. Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects in vivo. *Peerj*, 5, e3041.
- Kobylewski, S. y Jacobson, M. F. 2012. Toxicology of food dyes. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 18(3), 220-246.
- Kugler, F., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2007. Evaluation of the antioxidant capacity of betalainic fruits and vegetables. *Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik*, 81(1), 69-76.

- Labuschagne, P. 2018. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: a review. *Food Research International*, 107, 227-247.
- Lanuzza, F., Occhiuto, F., Monforte, M. T., Tripodo, M. M., D'Angelo, V. y Galati, E. M. 2017. Antioxidant phytochemicals of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cladodes with potential anti-spasmodic activity. *Pharmacognosy Magazine*, 13(51), S424-S429.
- Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J. y Jang, Y. S. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6490-6496.
- León-Martínez, F. M., Méndez-Lagunas, L. L. y Rodríguez-Ramírez, J. 2010. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 81(4), 864–870.
- León-Martínez, F. M., Rodríguez-Ramírez, J., Medina-Torres, L. L., Méndez Lagunas, L. L. y Bernad-Bernad, M. J. 2011. Effects of drying conditions on the rheological properties of reconstituted mucilage solutions (*Opuntia ficus-indica*). *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 439-445.
- Lippert, C. 2016. True colors. Consumer preference for natural colors and what it means for dairy. Lycored, SARL (Switzerland). Disponible en <https://www.lycored.com/wp-content/themes/lycored/dist/images/true-colors-paper.pdf> (Visitado 16-09-2020).
- Liveri, M. L. T., Sciascia, L., Allegra, M., Tesoriere, L. y Livrea, M. A. 2009. Partition of indicaxanthin in membrane biomimetic systems. A kinetic and modeling approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10959-10963.
- Lunadei, L., Galleguillos, P., Diezma, B., Lleó, L. y Ruiz-Garcia, L. 2011. A multispectral vision system to evaluate enzymatic browning in fresh-cut apple slices. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 225-234.
- MarketsandMarkets. 2020. *Food encapsulation market by shell material, technology, application, method, core phase, and region- global forecast to 2025* [Online]. Disponible en: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/food-encapsulation-advanced-technologies-and-global-market-68.html> [Visitado 09-09-2020].
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L. y Ferreira, I. 2017. Coloring attributes of betalains: a key emphasis on stability and future applications. *Food & Function*, 8(4), 1357-1372.

- Mata, A., Ferreira, J. P., Semedo, C., Serra, T., Duarte, C. M. M. y Bronze, M. R. 2016. Contribution to the characterization of *Opuntia* spp. juices by LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 210, 558-565.
- Matulka, R. A. y Tardy, A. L. 2014. Global focus: food colours vs colouring foods in the USA, EU, China, Russia and Brazil. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 25(3), 7-9.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., O Warner, J. y Stevenson, J. 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 370(9598), 1560-1567.
- McGarvie, D. y Parolis, H. 1981a. The acid-labile, peripheral chains of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Research*, 94(1), 57-65.
- McGarvie, D. y Parolis, H. 1981b. Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Research*, 88(2), 305-314.
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana-Sánchez, B. y Katthain, R. 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus-indica*). *Food Hydrocolloids*, 14(5), 417-424.
- Medina-Torres, L., Calderas, F., Ramírez, D. M. N., Herrera-Valencia, E. E., Bernad, M. J. B. y Manero, O. 2017. Spray drying egg using either maltodextrin or nopal mucilage as stabilizer agents. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 54(13), 4427-4435.
- Medina-Torres, L., García-Cruz, E. E., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Sánchez-Olivares, G., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E. y Rodríguez-Ramírez, J. 2013. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*). *Lwt-Food Science and Technology*, 50(2), 642-650.
- MINSAL. 2019. Reglamento sanitario de los alimentos (D.OF. 13.05.97). In: Salud, M. d. (ed.). Santiago, Chile.
- MMA. 2020. *Economía circular* [Online]. Chile: @MMACHile. Disponible en: <https://mma.gob.cl/economia-circular/> [Visitado 05-08-2020].
- Mokrzycki, W. S. y Tatol, M. 2011. Colour difference  $\delta E$  - a survey. *Machine Graphics and Vision*, 20(4), 383-411.

- Monroy-Gutiérrez, T., Martínez-Damián, M. T., Barrientos-Priego, A. F., Gallegos-Vázquez, C., Cruz-Alvarez, O. y Vargas-Madriz, H. 2017. Bioactive compounds and antioxidant capacity in fruits of xocotuna, cactus pear and xoconostole (*Opuntia* spp.). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(3), 263-272.
- Morales, M., Sáenz, C. y Robert, P. 2009. Bioactive compounds in toppings from colored cactus pear cultivated in Chile. *Acta Horticulturae*, 811, 127-130.
- Moßhammer, M. R., Maier, C., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2006a. Impact of thermal treatment and storage on color of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) L Mill. cv. 'Gialla') juices. *Journal of Food Science*, 71(7), C400-C406.
- Moßhammer, M. R., Rohe, M., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2007. Stability of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill. cv. 'Gialla') betalains as affected by the juice matrix and selected food additives. *European Food Research and Technology*, 225(1), 21-32.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2005a. Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus cacti* and betalain-containing model solutions derived therefrom. *Food Research International*, 38(8-9), 975-981.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2005b. Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(2), 221-231.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2006b. Cactus pear fruits (*Opuntia* spp.): a review of processing technologies and current uses. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 8, 1-25.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2006c. Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(4), 275-287.
- Moussa-Ayoub, T. E., Abd El-Hady, E. A., Omran, H. T., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W. y Rohn, S. 2014. Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. *Food Research International*, 64, 864-872.
- Nielsen. 2015. We are what we eat. Healthy eating trends around the world, Nielsen, C. USA/Netherlands.

- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M. y Fernández-López, J. A. 2009. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 471-479.
- ODEPA. 2019. Catastro frutícola Cirén-Odepa. *Anual*. Chile: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias.
- Osborne, D. R. y Voogt, P. 1978. Part II Chapter 6 Methods for the analysis of nutrients in food. *The Analysis of Nutrients in Foods*. First ed. London, Great Britain. Academic Press Inc Ltd.
- Otálora, M. C., Barbosa, H. D., Perilla, J. E., Osorio, C. y Nazareno, M. A. 2019. Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. *Lwt-Food Science and Technology*, 103, 222-227.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A. y Osorio, C. 2015. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 187, 174-181.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Osorio, C. y Nazareno, M. A. 2017. Encapsulated cactus pigments as food colorants. Stability and uses in a food model system. *IX International Congress on cactus pear and cochineal*. Coquimbo. Chile.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Osorio, C. y Nazareno, M. A. 2018. Encapsulation of cactus (*Opuntia megacantha*) betaxanthins by ionic gelation and spray drying: a comparative study. *Food Research International*, 111, 423-430.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G. V., Welti-Chanes, J. y Swanson, B. G. 1999. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *Journal of Food Science*, 64(1), 42-45.
- Piattelli, M., Minale, L. y Prota, G. 1965. Pigments of Centrospermae—III. Betaxanthins from *Beta vulgaris* L. *Phytochemistry*, 4(1), 121-125.
- Piga, A., Caro, A. D., Pinna, I. y Agabbio, M. 2003. Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 257-262.
- Quinzio, C., Ayunta, C., Alancay, M., de Mishima, B. L. y Iturriaga, L. 2018. Physicochemical and rheological properties of mucilage extracted from *Opuntia ficus-indica* (L. Miller). Comparative study with guar gum and

- xanthan gum. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 459-470.
- Ramadan, M. F. y Morsel, J. T. 2003a. Lipid profile of prickly pear pulp fractions. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 1(2), 66-70.
- Ramadan, M. F. y Morsel, J. T. 2003b. Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). *Food Chemistry*, 82(3), 339-345.
- Ramadan, M. F. y Morsel, J. T. 2003c. Recovered lipids from prickly pear *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill peel: a good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. *Food Chemistry*, 83(3), 447-456.
- Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M., Gabr, A. M. M., Ahmed, A. R., Knorr, D. y Smetanska, I. 2014. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 51(9), 2216-2221.
- Reis, C. M. G., Gouveia, C., Vitorino, M. C., Gazarini, L. C., Ribeiro, M. M. y Peres, F. 2017. Bioactive compounds and morphology in *Opuntia* spp. fruits from Portuguese ecotypes. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23(6), 929-938.
- Researchnester.com. 2020. *Global natural food colors market demand, size and forecast, 2016 to 2023* [Online]. Disponible en: <http://www.researchnester.com/reports/natural-food-colors-market-global-demand-growth-analysis-opportunity-outlook-2023/232> [Visitado 06-05-2020].
- Reyes-Ocampo, I., Córdova-Aguilar, M. S., Guzmán, G., Blancas-Cabrera, A. y Ascanio, G. 2019. Solvent-free mechanical extraction of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1), 1-9.
- Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C. y Sáenz, 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(2), 1039-1045.
- Rodríguez-Sánchez, J. A., Victoria, M. T. C. y Barragan-Huerta, B. E. 2017. Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus*: Stability and use in food. *Food Research International*, 91, 63-71.
- Ruiz-Gutiérrez, M. G., Amaya-Guerra, C. A., Quintero-Ramos, A., Pérez-Carrillo, E. y Meléndez-Pizarro, C. O. 2017. Use of red cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) encapsulated powder to pigment extruded cereal. *Journal of Food Quality*, 2017, 1-12.

- Ruiz-Gutiérrez, M. G., Amaya-Guerra, C. A., Quintero-Ramos, A., Ruiz-Anchondo, T. D., Gutiérrez-Urbe, J. A., Baez-González, J. G., Lardizabal-Gutiérrez, D. y Campos-Venegas, K. 2014. Effect of soluble fiber on the physicochemical properties of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) encapsulated using spray drying. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 755-763.
- Rymbai, H., Sharma, R. R. y Srivastav, M. 2011. Biocolorants and its implications in health and food industry - a review. *International Journal of PharmTech Research*, 3(4), 2228-2244.
- Sáenz, C., Berger, H., Corrales, J. G., Galletti, L., García, V., Higuera, I., Mondragón, C., Rodríguez-Félix, A., Sepúlveda, E. y Varnero, M. T. 2006. *Utilización agroindustrial del nopal*, Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y La Alimentación.
- Sáenz, C., Cancino, B. y Robert, P. 2012. Red betalains from *Opuntia* spp.: Natural colorants with potential applications in foods. *Israel Journal of Plant Sciences*, 60(3), 291-299.
- Sáenz, C., Gómez, H., Fabry, A. M., Cancino, B., Vergara, C. y Paz, R. 2015. Soft-drinks prepared with pulp, ultrafiltered and nanofiltered purple cactus pear microparticles: betalains stability. *Acta Horticulturae*, 1067, 343-348.
- Sáenz, C. y Sepúlveda, E. 2001a. Cactus-pear juices. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 4, 3-10.
- Sáenz, C. y Sepúlveda, E. 2001b. Ecotipos coloreados de tuna (*Opuntia ficus-indica*). *Aconex (Chile)*, 72, 29-32.
- Sáenz, C., Sepúlveda, E. y Matsuhiro, B. 2004. *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*, 57(3), 275-290.
- Sáenz, C., Tapia, S., Chávez, J. y Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616-622.
- Saih, F. E., Andreoletti, P., Mandard, S., Latruffe, N., El Kebbaj, M. S., Lizard, G., Nasser, B. y Cherkaoui-Malki, M. 2017. Protective effect of cactus cladode extracts on peroxisomal functions in microglial BV-2 cells activated by different lipopolysaccharides. *Molecules*, 22(1), 102.
- Sandoval-Aldana, A., Rodríguez-Sandoval, E. y Ayala-Aponte, A. 2004. Encapsulación de aditivos para la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, 5(2), 73-83.

- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. A. y Serna-Saldivar, S. O. 2011. Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7054-7061.
- Saricoban, C. y Yilmaz, M. T. 2010. Modelling the effects of processing factors on the changes in colour parameters of cooked meatballs using response surface methodology. *World Applied Sciences Journal*, 9(1), 14-22.
- Schwartz, S. J., Cooperstone, J. L., Cichon, M. J., von Elbe, J. H. y Giusti, M. M. 2017. Colorants. In: Damodaran, S., Parkin, K. L. y Fennema, O. R. (eds.) *Fennema's Food Chemistry*. Fifth ed. Boca Raton, Florida. United States. CRC Press Taylor & Francis Group LLC.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E. y Aceituno, C. 2007. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, 68(4), 534-545.
- Shaaruddin, S., Ghazali, H. M., Mirhosseini, S. H. y Muhammad, K. 2017. Stability of betanin in pitaya powder and confection as affected by resistant maltodextrin. *Lwt-Food Science and Technology*, 84(2017), 129-134.
- Shahidi, F. y Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501-547.
- Shinoda, Y., Komura, H., Homma, S. y Murata, M. 2005. Browning of model orange juice solution: factors affecting the formation of decomposition products. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69(11), 2129-2137.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teofilo, R. F. y Nolasco de Oliveira, I. R. 2013. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538-544.
- Singer, J. W. y Vonelbe, J. H. 1980. Degradation rates of vulgaxanthine-L. *Journal of Food Science*, 45(3), 489-491.
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Slade, L. y Levine, H. 1991. Beyond water activity - recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(2-3), 115-360.

- Slimen, I. B., Najar, T. y Abderrabba, M. 2017. Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 675-689.
- Soto-Castro, D., Gutiérrez-Chávez, M., León-Martínez, F., Santiago-García, A., Aragón-Lucero, I. y Antonio-Antonio, F. 2019. Spray drying microencapsulation of betalain rich extracts from *Escontria chiotilla* and *Stenocereus queretaroensis* fruits using cactus mucilage. *Food Chemistry*, 272, 715-722.
- Stintzing, F. C. y Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15(1), 19-38.
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W. G., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. y Felker, P. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442-451.
- Stintzing, F. C., Kugler, F., Carle, R. y Conrad, J. 2006. First C-13-NMR assignments of betaxanthins. *Helvetica Chimica Acta*, 89(5), 1008-1016.
- Stintzing, F. C., Schieber, A. y Carle, R. 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology*, 212(4), 396-407.
- Stintzing, F. C., Schieber, A. y Carle, R. 2002. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2302-2307.
- Strack, D., Vogt, T. y Schliemann, W. 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247-269.
- Suzanne, E., Absi, N. y Borodin, V. 2020. Towards circular economy in production planning: Challenges and opportunities. *European Journal of Operational Research*, 287(1), 168-190.
- Swaroop, V. R., Dinesh, D. y Vijayakumar, T. 2011. Genotoxicity of synthetic food colorants. *Journal of Food Science and Engineering*, 1(2), 128-134.
- Teixeira, M. L. y Peres, F. 2009. Food additive intake and health effects: public health challenges in Brazil. *Cadernos De Saude Publica*, 25(8), 1653-1666.

- Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D. y Livrea, M. A. 2004a. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 941-945.
- Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M. y Livrea, M. A. 2004b. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2), 391-395.
- Tonon, R. V., Brabet, C. y Hubinger, M. D. 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411-418.
- Tonon, R. V., Brabet, C. y Hubinger, M. D. 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907-914.
- Tontul, I. y Topuz, A. 2017. Spray-drying of fruit and vegetable juices: effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science & Technology*, 63(2017), 91-102.
- Trachtenberg, S. y Mayer, A. M. 1981. Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Phytochemistry*, 20(12), 2665-2668.
- Trejo-González, A., Gabriel-Ortiz, G., Puebla-Pérez, A. M., Huizar-Contreras, M. D., Munguia-Mazariegos, M. D. R., Mejia-Arreguin, S. y Calva, E. 1996. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(1), 27-33.
- Vargas-Campos, L., Valle-Guadarrama, S., Martínez-Bustos, F., Salinas-Moreno, Y., Lobato-Calleros, C. y Calvo-López, A. D. 2018. Encapsulation and pigmenting potential of betalains of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 55(7), 2436-2445.
- Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P. y Robert, P. 2014. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food Chemistry*, 157, 246-251.
- Wang, S., Konkol, E. y Langrish, T. A. G. 2011. Spray drying of fruit juice using proteins as additives. *Drying Technology*, 29(16), 1868-1875.

- Wang, Y., Li, D., Wang, L. J., Li, S. J. y Adhikari, B. 2010. Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 128-133.
- Wilcox, M. E., Wyler, H. y Dreiding, A. S. 1965. Stereochemie von betanidin und isobetanidin. 8. mitteilung. zur konstitution des randenfarbstoffes betanin. *Helvetica Chimica Acta*, 48(5), 1134-1147.
- Yu, L. 2001. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(1), 27-42.
- Zuanon, L. A. C., Fuzari, N. C., Ferreira, S., Freitas, M. L. F., Moser, P. y Nicoletti, V. R. 2019. Production and storage properties of spray-dried red beet extract using polysaccharide-based carrier systems. *International Journal of Food Engineering*, 15(7), 1-15.

## ANEXOS

### Anexo I. Publicaciones y presentaciones en congresos

#### Publicaciones

- ✚ Carmona, J. C., Robert, P., Vergara, C. y Sáenz, C. 2021. Microparticles of yellow-orange cactus pear pulp (*Opuntia ficus-indica*) with cladode mucilage and maltodextrin as a food coloring in yogurt. *LWT – Food Science and Technology*. 138, 110672. DOI: [10.1016/j.lwt.2020.110672](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110672).
- ✚ Carmona, J. C., Robert, P., y Sáenz, C. Yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) microparticles as colorants: stability in storage and a food matrix. *Food Science and Technology International*, (en revisión).
- ✚ Sáenz, C., Carmona, J. C., Vergara, C., y Robert, P. 2021. Cactus pear as coloring food: application in different food matrices. *In: Ramadan, M. F., Moussa-Ayoub, T.E. y Rohn, S. (eds.) Opuntia spp.: Chemistry, Bioactivity, and Industrial Applications*. Cham, Switzerland. Springer Nature Switzerland AG.(en revisión).
- ✚ Carmona, J. C., Fabry, A. M. y Sáenz, C. 2019. Coloring foods from yellow-orange cactus pear. *Acta Horticulturae*, 1247, 15-22. DOI: [10.17660/ActaHortic.2019.1247.3](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1247.3).

#### Presentaciones en congresos

- ✚ Carmona, J. C., Sáenz, C., Vergara, C. y Robert, P. 2018. Optimización de la encapsulación de pulpa de tuna anaranjada mediante superficie respuesta. *V Congreso Internacional de Ingeniería Química, Biotecnológica y Alimentaria*, La Habana, Cuba.
- ✚ Sáenz, C., Pinto, R., Fabry, A. M., Carmona, J. C., Apablaza, E. y Prat, M. L. 2018. Potencial agroalimentario de cactáceas del norte de Chile. *V*

*Congreso Internacional de Ingeniería Agroindustrial*, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

- ✚ Sáenz, C., García, N., Carmona, J. C. y Robert, P. 2018. *Optimización del proceso de extracción acuosa y secado del mucílago de nopal (Opuntia ficus-indica)*. V Congreso Internacional de Ingeniería Agroindustrial, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.
- ✚ Carmona, J. C., Sáenz, C. y Robert, P. 2018. Effect of spray drying process on physicochemical properties of mucilage extracted from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) cladodes. *International Conference on Advanced Polymers, Biomaterials and Nanomedicine*, Flic en Flac, Mauricio.
- ✚ Carmona, J. C., Fabry, A. M., Saéenz, C. 2017. Coloring foods from yellow-orange cactus pear. *IX International Congress on cactus pear and Cochineal*, Coquimbo, Chile.
- ✚ Sáenz, C., Pinto, R., Fabry, A. M., Carmona, J. C., Franck, N. 2017. *Characterization of rumba fruits (Corryocactus brevistylus) from northern Chile*. IX International Congress on cactus pear and cochineal, Coquimbo, Chile.

### **Otras presentaciones**

- ✚ Escuela de verano DOCNUTAL. 2019. Optimización de la encapsulación de pulpa de tuna anaranjada mediante superficie respuesta. Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago.
- ✚ VI Jornadas de Investigación DOCNUTAL. 2018. Efecto del secado por atomización en las propiedades físicas y químicas del mucílago extraído de las paletas de nopal (*Opuntia ficus-indica*) para su uso como agente encapsulante. Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago.
- ✚ Jornada de Unidades de Investigación DOCNUTAL. 2017. Obtención y evaluación de un “alimento colorante” de frutos de tuna anaranjada (*Opuntia ficus-indica*) para su aplicación en alimentos. Instituto de Nutrición y Alimentos, Santiago.

## **Anexo II. Determinación del contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965)**

### **Fundamento**

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

### **Materiales**

- + Agua destilada
- + Reactivo de Folin-Ciocalteu
- + Carbonato de sodio al 20%
- + Puntas de micropipeta de 20 – 200  $\mu$ L
- + Puntas de micropipeta de 100 – 1000  $\mu$ L
- + Puntas de micropipeta de 1 – 5 mL
- + Micropipetas (hasta 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L y 5 mL)
- + Cuentagotas plástico
- + Matraz de aforo (10, 25 mL)

### **Procedimiento**

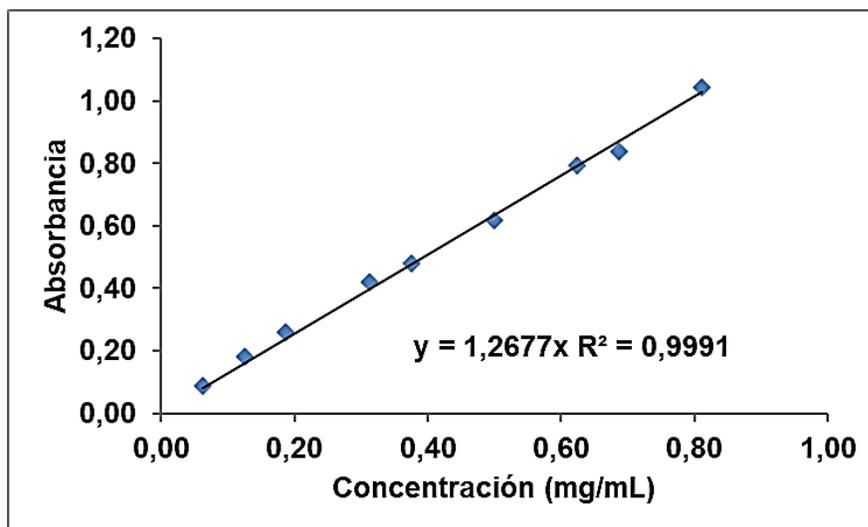
#### **Preparación de la muestra**

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

#### **Método Folin-Ciocalteu**

En un matraz aforado de 10 mL se colocó 0,1 mL de muestra y se agregó 4,9 mL de agua destilada. Luego, se agregó 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se dejó en reposo durante 3 minutos. Posteriormente se añadió 1,7 mL de carbonato de sodio al 20%, se aforó con agua destilada y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad. En paralelo se preparó un blanco en cual se adicionó 5 mL de agua destilada, siguiendo el mismo procedimiento para la muestra. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Para los cálculos del contenido de polifenoles totales, se realizó una curva de calibrado

de ácido gálico ( $y = 1,2677 x$ ;  $R^2 = 0,99$ ); donde:  $y$  es la absorbancia de la muestra (U.A.) y  $x$  es la concentración de polifenoles ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).



Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

### Anexo III. Determinación del contenido de azúcares totales por el método de la Antrona (Osborne y Voogt, 1978)

#### Fundamento

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

#### Materiales

- + Ácido perclórico al 52%
- + Reactivo de Antrona
- + Solución de glucosa (0,03%; 0,05%; 0,07%; 0,1%; 0,15% y 0,17%)
- + Agua destilada
- + Matraz Erlenmeyer (250 mL)
- + Matraz de aforo (100; 250 mL)
- + Tubos de vidrio con tapa
- + Papel de filtro

#### Procedimiento

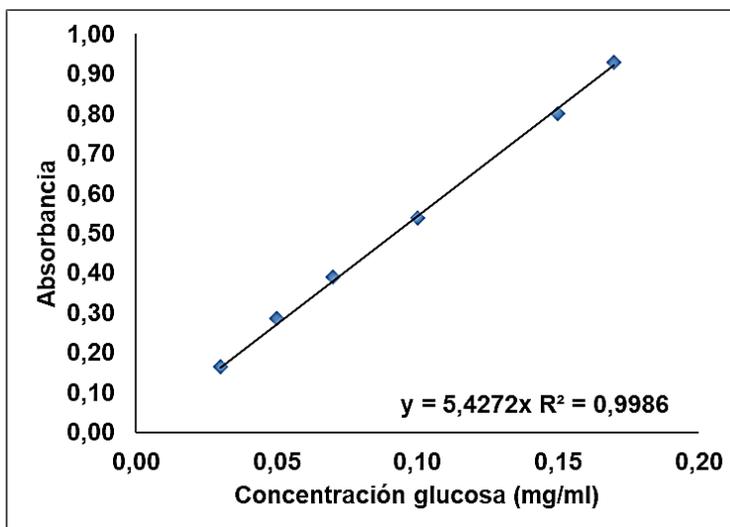
##### Preparación de soluciones:

- + **Ácido perclórico al 52%:** se añadieron 270 mL de ácido perclórico (peso específico 1,7) a 100 ml de agua. Esta mezcla se realizó en un baño de agua fría para enfriar la mezcla.
- + **Ácido sulfúrico al 76%:** se preparó añadiendo cuidadosamente 760 mL de ácido (peso específico 1,84) a 330 mL de agua destilada. La mezcla se enfrió antes de usar.
- + **Reactivo de Antrona:** se preparó al 0,1% disolviendo el reactivo en el ácido sulfúrico al 76%. Se preparó solo la cantidad suficiente para los análisis del día.
- + **Soluciones de glucosa:** se disolvieron 100 mg de glucosa en 100 mL de agua destilada, luego se diluyeron 3, 5, 7, 10, 15 y 17 mL de esta solución en matraces de aforo de 100 mL, aforando con agua destilada. Se preparó una curva de calibración con glucosa.

### Método de Antrona

Se pesaron 2 g de muestra húmeda, en un matraz Erlenmeyer con tapa y se mezclaron con 10 mL de agua destilada y 15 mL de ácido perclórico al 52%, una vez agitada la mezcla se dejó reposar por 12 horas para producir la hidrólisis de la muestra. Después de la hidrólisis, se adicionó agua destilada hasta 100 mL aproximadamente, la mezcla se filtró en papel filtro y se recibió en un matraz aforado de 250 mL, el filtro se lavó con agua destilada y luego se aforó. De esta solución, se tomaron 10 mL y se agregaron a un matraz de 100 mL aforando con agua destilada. De esta última solución se tomó una alícuota de 1 mL y se agregó a un tubo con tapa, en el cual se agregaron 5 mL del reactivo de Antrona. El tubo se agitó en un vórtex y se llevó a un baño a temperatura de ebullición por 12 minutos; luego, se enfrió rápidamente con agua fría y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm. Paralelamente se preparó un tubo con 1 mL de agua destilada más los 5 mL de reactivo de Antrona (blanco) y un set de 6 tubos con 1 mL de soluciones de glucosa (0,03%; 0,05%; 0,07%; 0,1%; 0,15% y 0,17%) más los 5 mL de reactivo de Antrona en cada uno para realizar la curva de calibración.

Para los cálculos del contenido de azúcares totales, se empleó una curva de calibrado de glucosa ( $y = 5,4272x$ ;  $R^2 = 0,99$ ), donde:  $y$  es la absorbancia de la muestra (U.A.) y  $x$  es la concentración de glucosa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).



Curva de calibración de glucosa para la determinación de azúcares totales por el método de Antrona.

## Anexo IV. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ORAC (Dávalos *et al.*, 2004)

### Fundamento

Consiste en determinar mediante fluorimetría la capacidad del compuesto estudiado para retardar la caída en la fluorescencia como consecuencia de la oxidación de la fluoresceína, en presencia de un agente oxidante (AAPH).

### Materiales

- + Cloruro de Sodio (NaCl)
- + Cloruro de Potasio (KCl)
- + Dihidrógeno Fosfato de Sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- + Dihidrógeno Fosfato de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- + Ácido Clorhídrico (HCl)
- + Hidróxido de Sodio (NaOH)
- + Fluoresceína
- + AAPH
- + Estándar Trolox

### Procedimiento

#### Preparación de soluciones

- + **Solución PBS (buffer):** para un litro de solución buffer se pesaron las siguientes cantidades: 8,06 gr. de NaCl; 0,22 gr. de KCl; 1,15 gr.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Di hidrato; 0,20 gr.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Se disolvieron en 750 mL de agua milli-Q y se ajustó a pH 7,0 con HCL o NaOH al 10%, se enrazó a 1 L y se agitó.
- + **Preparación solución stock fluoresceína (duración 7 días refrigerado):** se pesaron exactamente alrededor de 22 mg de fluoresceína en un matraz aforado ámbar de 50 mL, se disolvió y se enrazó con solución de PBS.
- + **Solución diaria fluoresceína (duración 1 día a temperatura ambiente):** se tomó una alícuota de 0,050 mL de solución stock en un matraz aforado ámbar de 10 mL, se homogeneizó y se realizó una segunda dilución de 2 mL en un matraz aforado de 100 mL, se aforó con solución de PBS pH 7,0 y se homogeneizó agitando.

- ✚ **Solución radical AAPH (duración 1 día refrigerada):** concentración: 46 mg mL<sup>-1</sup>. Se preparó el volumen necesario de solución a ocupar de acuerdo con la cantidad de muestras a analizar en el día. Se pesó la cantidad de masa necesaria y se trasvasió en un matraz de volumen apropiado con tapa, se disolvió con solución PBS previamente mantenida a 37°C, se agitó y homogeneizó.
- ✚ **Solución Stock Estándar Trolox (duración dos días refrigerado en ausencia de luz):** se pesó exactamente alrededor de 25 mg de estándar Trolox en un matraz aforado ámbar de 50 mL, se disolvió directamente y se aforó con buffer PBS a 37 °C.

Curva de calibrado estándar Trolox (duración un día en ausencia de luz)

Punto	Alícuota	Vol. matraz	Concentración (µM)	Solución
1	0,5 mL (Sol Stock)	10 mL	100	1
2	5,0 mL (Sol. 1)	10 mL	50	2
3	5,0 mL (Sol. 2)	10 mL	25	3
4	5,0 mL (Sol. 3)	10 mL	12,5	4
5	5,0 mL (Sol. 4)	10 mL	6	5
6	10,0 mL (buffer)	10 mL	0	buffer

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

Previo a tratar la muestra se centrifugó por 10 min y se filtró por 0,45 µm. Se diluyeron 50 µL de la muestra original en un matraz aforado de 50 mL con PBS y una alícuota de este (50 µL) en un matraz aforado de 20 mL con solución de PBS.

### Método de ORAC

En cada pocillo de la placa, se colocaron 150 µL de fluoresceína, 25 µL de AAPH, 25 µL de blanco, muestra y estándar. Se agitó suavemente por algunos segundos y se colocó la placa en el instrumento iniciando el programa. La fluorescencia se midió inmediatamente después de la adición de AAPH hasta que la intensidad fue menor al 5% del valor de la lectura inicial. Los valores ORAC, expresados como µmoles equivalentes de Trolox, se calcularon mediante la ecuación (14), donde AUC es el área bajo la curva, C es la concentración del estándar de Trolox y K es el factor dilución de las muestras (K x 0,001 x 0,025).

$$ORAC = (AUC_{muestra} - AUC_{blanco}) / (AUC_{Trolox} - AUC_{blanco}) * C_{Trolox} * K \quad (14)$$

## Anexo V. Determinación del contenido de betalaínas por espectrofotometría (Stintzing *et al.*, 2005)

### Materiales

- ✚ Buffer Mcllvaine pH 6,5

### Procedimiento

#### Preparación buffer Mcllvaine pH 6,5:

- ✚ **Solución A:** 0,1 M ácido cítrico ( $C_6H_8O_7 \cdot 1H_2O$ ) = 21,01 g L<sup>-1</sup>
- ✚ **Solución B:** 0,2 M dihidrógeno fosfato de sodio ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) = 35,60 g L<sup>-1</sup>
- ✚ Para obtener una solución a pH 6,5 se mezclan 29,65 mL de A y 70,35 mL de B.

#### Preparación de la muestra

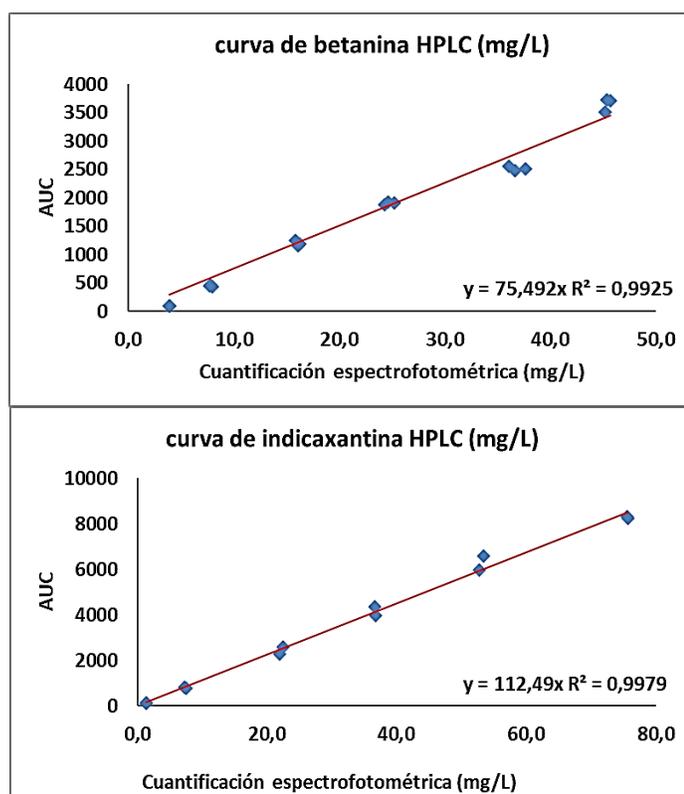
- ✚ **Pulpa de tuna:** se pesaron 4 g de muestra de pulpa y se aforó con agua destilada en un matraz de aforo de 25 mL, posteriormente se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu m$ , se tomó una alícuota de 1 mL que se aforó en un matraz de 10 mL con la solución buffer Mcllvaine pH 6,5. Luego se leyó en espectrofotómetro a longitudes de onda de 480, 538 y 600 nm, respectivamente.
- ✚ **Preparación de estándares de betanina e indicaxantina:** la separación por columna de betanina e indicaxantina, se realizó de acuerdo al método propuesto por Alfaro (2013). Se colocaron 30 g de gel de sílice (0,063 – 0,200 mm de tamaño de poro, 70 – 230 Mesh ASTM, Merck) a 105 °C en una estufa de secado durante una hora y luego se enfrió 15 minutos en un desecador. El gel de sílice frío se colocó en una columna abierta de vidrio y se acondicionó con buffer Mcllvaine. El extracto de betalaínas (pulpa de tuna filtrada por 0,22  $\mu m$ ) se agregó en la parte superior de la columna, luego se adicionó buffer como fase móvil, eluyendo primero el pigmento de color violeta (betacianinas) y luego el pigmento amarillo (betaxantinas).
- ✚ **Extracto extraído de la columna:** se tomó una alícuota de 0,25 mL y se aforó con la solución de Mcllvaine en un matraz de 10 mL. Se realizaron diluciones sucesivas, se leyó en espectrofotómetro a longitudes de onda

de 480, 538 y 600 nm, respectivamente y en HPLC, con el método descrito por Fernández-López y Almela (2001).

El contenido espectrofotométrico de betacianinas y betaxantinas, expresado como betanina e indicaxantina, respectivamente, se calculó según la ecuación (15), donde B es el contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) ( $\text{mg g}^{-1}$ ) expresado como equivalente de betanina o indicaxantina, A es la diferencia de absorbancia entre la muestra y su respectivo factor de corrección a 600 nm, FD es el factor de dilución, PM es el peso molecular (betaninas  $550 \text{ g mol}^{-1}$  e indicaxantinas  $308 \text{ g mol}^{-1}$ ), V es el volumen inicial al que es llevado la muestra,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (betaninas  $60000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e indicaxantinas  $48000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), L es la distancia que recorre la luz en la cubeta (1 cm) y P es el peso de la muestra (g).

$$B = (A \times FD \times PM \times V \times 100) / (\epsilon \times L \times P) \quad (15)$$

A partir de las concentraciones determinadas por espectrofotometría para los pigmentos puros (betanina e indicaxantina) y el área por HPLC, se graficó una curva de calibración para la determinación posterior de los contenidos de pigmentos.



Curva de calibración de betanina e indicaxantina para la determinación de betalaínas por HPLC

## Anexo VI. Optimización de la encapsulación del sistema P-MD mediante metodología de superficie respuesta

### Información del Diseño

<b>Tipo de estudio</b>	<b>Superficie respuesta</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Aleatorizado</b>
<b>Tipo de diseño</b>	Compuesto Central	<b>Corridas</b>	12
<b>Modelo</b>	Cuadrático	<b>Bloques</b>	Sin Bloques

### Factores

<b>Factor</b>	<b>Nombre</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Codificado bajo</b>	<b>Codificado alto</b>	<b>Medio</b>
<b>A</b>	Temperatura (°C)	110	180	-1 ↔ 110	+1 ↔ 180	145
<b>B</b>	Relación P/AE	1:1	5:1	-1 ↔ 1:1	+1 ↔ 5:1	3:1

### Respuestas

<b>Respuesta</b>	<b>Nombre</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>Modelo</b>
<b>R1</b>	EE (%)	92	99,7	97,13	2,48	Cuadrático reducido
<b>R2</b>	Y (%)	40,4	62,3	50,98	7,52	Cuadrático reducido

### Respuesta 1: EE

#### Estadísticas del ajuste

<b>D.E.</b>	0,9386	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9090
<b>Media</b>	97,13	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,8571
<b>C.V. %</b>	0,9664	<b>R<sup>2</sup> predicho</b>	0,6728
		<b>Precisión adec.</b>	12,2141

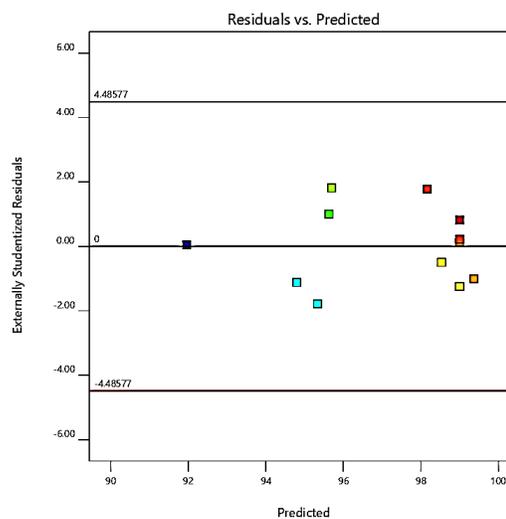
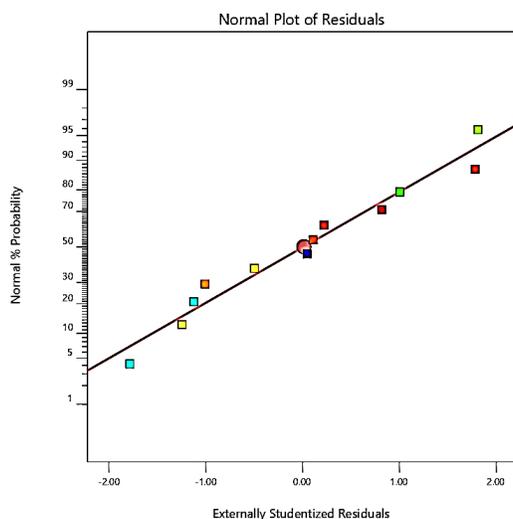
## ANOVA para el modelo cuadrático reducido

	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
Modelo	61,64	4	15,41	17,49	0,0009*
A-Temperatura	12,04	1	12,04	13,67	0,0077*
B-Relación P/AE	20,91	1	20,91	23,73	0,0018*
A <sup>2</sup>	13,50	1	13,50	15,32	0,0058*
B <sup>2</sup>	6,00	1	6,00	6,81	0,0349*
Residuales	6,17	7	0,8810		
Falta de ajuste	4,63	4	1,16	2,25	0,2652
Error puro	1,54	3	0,5133		
Corr. Total	67,80	11			

\*: significativo

## Ecuación final

$$EE = 53,93861 + 0,573129 \text{ Temperatura} + 1,31677 \text{ Relación P/AE} - 0,001837 \text{ Temperatura}^2 - 0,375000 \text{ Relación P/AE}^2$$



## Gráficos de diagnóstico

**Respuesta 2: Y**

## Estadísticas del ajuste

<b>D.E.</b>	2,68	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9189
<b>Media</b>	50,98	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,8726
<b>C.V. %</b>	5,26	<b>R<sup>2</sup> predicho</b>	0,7833
		<b>Precisión adec.</b>	11,2934

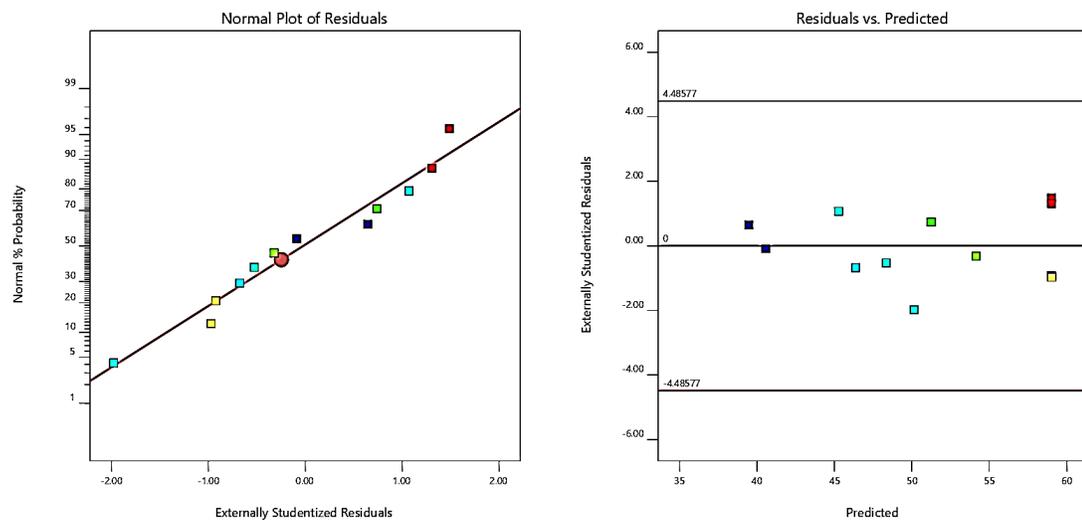
## ANOVA para el modelo cuadrático reducido

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>g.l.</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-valor</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	571,00	4	142,75	19,85	0,0006*
A-Temperatura	1,82	1	1,82	0,2524	0,6308
B-Relación P/AE	50,46	1	50,46	7,02	0,0330*
A <sup>2</sup>	184,81	1	184,81	25,70	0,0014*
B <sup>2</sup>	161,20	1	161,20	22,41	0,0021*
Residuales	50,35	7	7,19		
Falta de ajuste	21,14	4	5,28	0,5427	0,7202
Error puro	29,21	3	9,74		
Corr. Total	621,34	11			

\*: significativo

## Ecuación final

$$Y = -107,98151 + 1,98653 \text{ Temperatura} + 13,11250 \text{ Relación P/AE} - 0,006796 \text{ Temperatura}^2 - 1,94375 \text{ Relación P/AE}^2$$



Gráficos de diagnóstico

## Optimización múltiple

1 solución encontrada

Número	Temperatura	Relación P/AE	EE	Y	Deseabilidad
1	150	3:1	99,294	58,657	0,889

## Anexo VII. Optimización de la encapsulación del sistema P-M mediante metodología de superficie respuesta

### Información del diseño

<b>Tipo de estudio</b>	Superficie respuesta	<b>Subtipo</b>	Aleatorizado
<b>Tipo de diseño</b>	Compuesto central	<b>Corridas</b>	12
<b>Modelo</b>	Cuadrático	<b>Bloques</b>	Sin bloques

### Factores

Factor	Nombre	Mínimo	Máximo	Codificado bajo	Codificado alto	Media
A	Temperatura (°C)	110	180	-1 ↔ 110	+1 ↔ 180	145
B	Relación P/AE	3:1	5:1	-1 ↔ 3:1	+1 ↔ 5:1	4:1

### Respuestas

Respuesta	Nombre	Mínimo	Máximo	Media	D.E.	Modelo
R1	EE (%)	70,6	92,2	82,65	7,12	Cuadrático reducido
R2	Y (%)	3,6	10,8	6,67	2,43	Cuadrático reducido

### Respuesta 1: EE

#### Estadísticas del ajuste

<b>D.E.</b>	2,78	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9033
<b>Media</b>	82,65	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,8480
<b>C.V. %</b>	3,36	<b>R<sup>2</sup> predicho</b>	0,7101
		<b>Precisión adec.</b>	12,0762

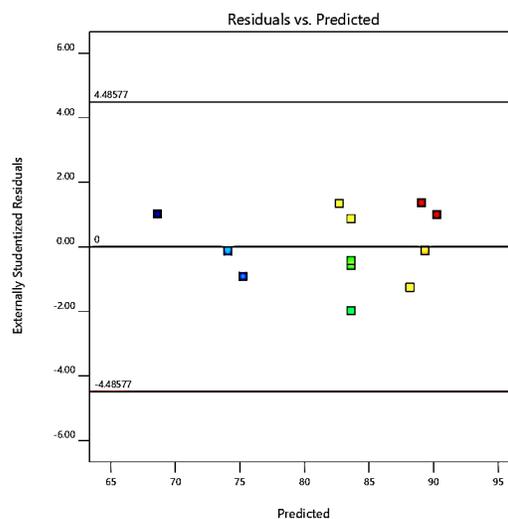
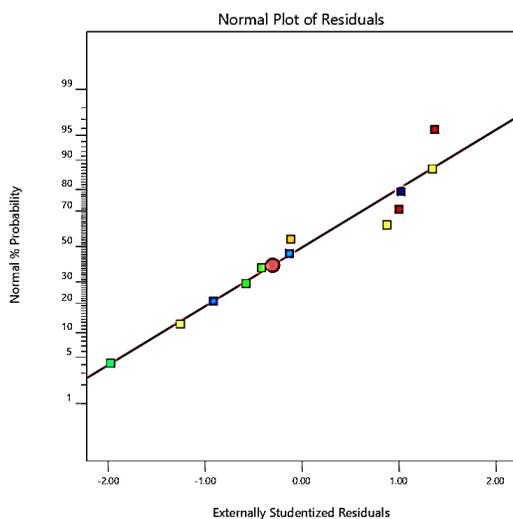
## ANOVA para el modelo cuadrático reducido

	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
Modelo	503,48	4	125,87	16,34	0,0012*
A-Temperatura	2,04	1	2,04	0,2651	0,6225
B-Relación P/AE	298,22	1	298,22	38,72	0,0004*
A <sup>2</sup>	97,61	1	97,61	12,67	0,0092*
B <sup>2</sup>	168,54	1	168,54	21,88	0,0023*
Residuales	53,91	7	7,70		
Falta de ajuste	33,87	4	8,47	1,27	0,4404
Error puro	20,05	3	6,68		
Corr. Total	557,39	11			

\*: significativo

## Ecuación final

$$EE = 86,02109 - 1,41558 \text{ Temperatura} + 56,55000 \text{ Relación P/AE} + 0,004939 \text{ Temperatura}^2 - 7,95000 \text{ Relación P/AE}^2$$



## Gráficos de diagnóstico

**Respuesta 2: Y.**

## Estadísticas del ajuste

<b>D.E.</b>	1,20	<b>R<sup>2</sup></b>	0,8211
<b>Media</b>	6,67	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,7540
<b>C.V. %</b>	18,04	<b>R<sup>2</sup> predicho</b>	0,4962
		<b>Precisión adec.</b>	7,4573

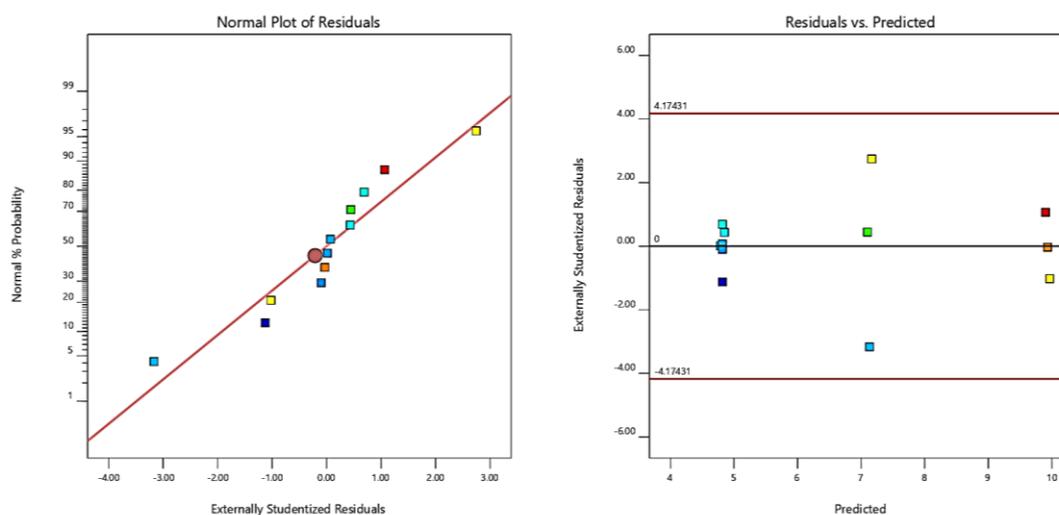
## ANOVA para el modelo cuadrático reducido

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>g.l.</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-valor</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	53,21	3	17,74	12,24	0,0023*
A-Temperatura	0,0067	1	0,0067	0,0046	0,9476
B-Relación P/AE	11,76	1	11,76	8,11	0,0215*
B <sup>2</sup>	41,44	1	41,44	28,59	0,0007*
Residuales	11,59	8	1,45		
Falta de ajuste	9,53	5	1,91	2,78	0,2149
Error puro	2,06	3	0,6867		
Corr. Total	64,80	11			

\*: significativo

## Ecuación final

$$Y = 70,02143 - 0,000952 \text{ Temperatura} - 31,13333 \text{ Relación P/AE} + 3,71667 \text{ Relación P/AE}^2$$



Gráficos de diagnóstico

## Optimización múltiple

Número	Temperatura	Relación P/AE	EE	Y	Deseabilidad
1*	180	3:1	89,333	9,900	0,871
2	180	3:1	89,422	9,811	0,867
3	110	3:1	88,167	9,967	0,848
4	110	3:1	88,439	9,691	0,836
5	175	3:1	87,674	9,905	0,832
6	110	3:1	88,552	9,574	0,830
7	175	3:1	87,567	9,905	0,829
8	115	3:1	86,766	9,962	0,813
9	168	3:1	85,635	9,912	0,781
10	122	3:1	84,877	9,955	0,764
11	154	3:1	83,229	9,925	0,717
12	135	3:1	83,027	9,943	0,712
13	180	4,7:1	80,639	5,788	0,376
14	180	4,8:1	80,481	5,822	0,376
15	180	4,8:1	80,246	5,874	0,376
16	110	4,7:1	80,494	5,638	0,360

\*: seleccionada

### Anexo VIII. Optimización de la encapsulación del sistema P-M+MD mediante metodología de superficie respuesta

#### Información del diseño

<b>Tipo de estudio</b>	Superficie respuesta	<b>Subtipo</b>	Aleatorizado
<b>Tipo de diseño</b>	Compuesto central	<b>Corridas</b>	12
<b>Modelo</b>	Cuadrático	<b>Bloques</b>	Sin bloques

#### Factores

Factor	Nombre	Mínimo	Máximo	Codificado bajo	Codificado alto	Media
A	Temperatura (°C)	110	180	-1 ↔ 110	+1 ↔ 180	145
B	Relación P/AE	3:1	5:1	-1 ↔ 3:1	+1 ↔ 5:1	4:1

#### Respuestas

Respuesta	Nombre	Mínimo	Máximo	Media	D.E.	Modelo
R1	EE (%)	87,7	95,4	92,21	2,22	Cuadrático reducido
R2	Y (%)	4,9	31,5	17,03	7,11	Cuadrático reducido

#### Respuesta 1: EE

##### Estadísticas del ajuste

<b>D.E.</b>	0,8586	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9049
<b>Media</b>	92,21	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,8505
<b>C.V. %</b>	0,9311	<b>R<sup>2</sup> predicho</b>	0,6781
		<b>Precisión adec.</b>	14,1945

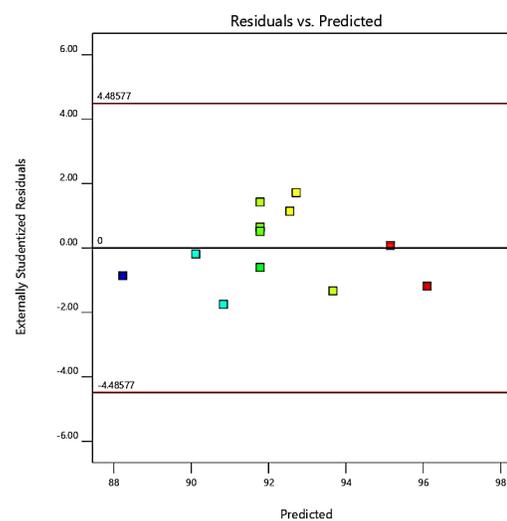
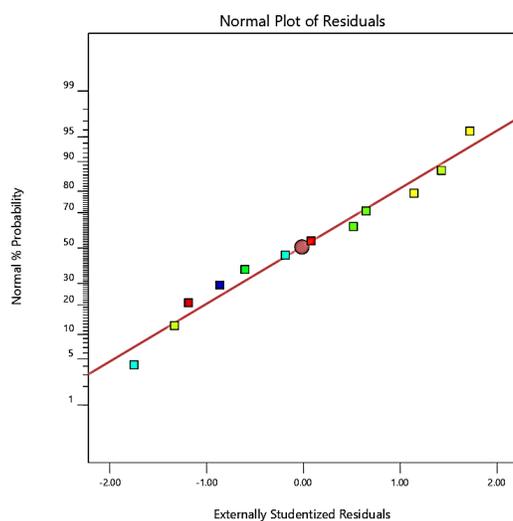
## ANOVA para el modelo cuadrático reducido

	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
Modelo	49,09	4	12,27	16,65	0,0011*
A-Temperatura	8,88	1	8,88	12,05	0,0104*
B-Relación P/AE	10,14	1	10,14	13,76	0,0076*
A <sup>2</sup>	25,63	1	25,63	34,76	0,0006*
B <sup>2</sup>	13,50	1	13,50	18,31	0,0037*
Residuales	5,16	7	0,7371		
Falta de ajuste	3,99	4	0,9975	2,56	0,2332
Error puro	1,17	3	0,3900		
Corr. Total	54,25	11			

\*: significativo

## Ecuación final

$$EE = 119,22993 - 0,768639 \text{ Temperatura} + 16,70000 \text{ Relación P/AE} + 0,002531 \text{ Temperatura}^2 - 2,2500 \text{ Relación}^2$$



## Gráficos de diagnóstico

**Respuesta 2: Y.**

## Estadísticas del ajuste

<b>D.E.</b>	3,03	<b>R<sup>2</sup></b>	0,8843
<b>Media</b>	17,03	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,8182
<b>C.V. %</b>	17,79	<b>R<sup>2</sup> predicho</b>	0,6093
		<b>Precisión adec.</b>	12,3565

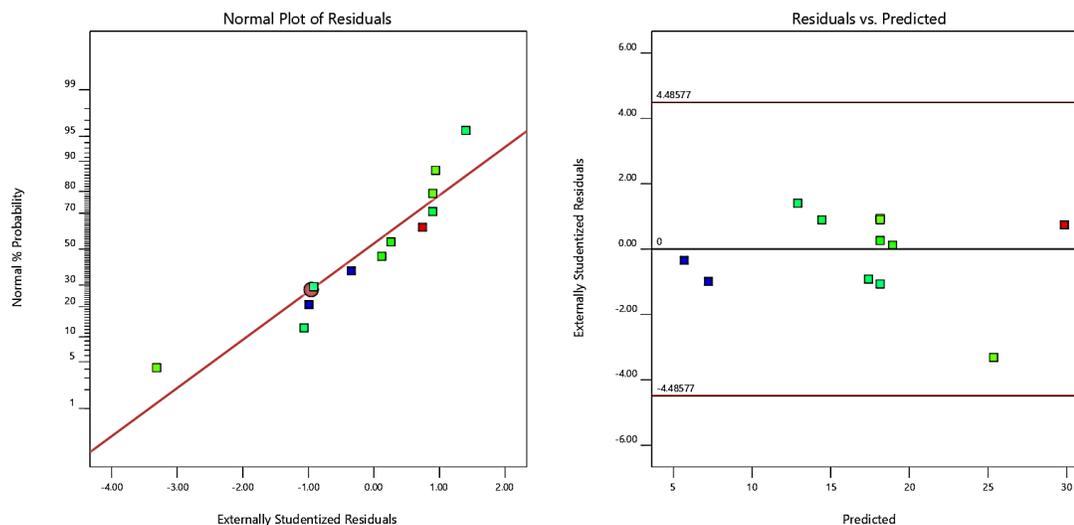
## ANOVA para el modelo cuadrático reducido

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>g.l.</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-valor</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	491,13	4	122,78	13,37	0,0022*
A-Temperatura	3,53	1	3,53	0,3842	0,5550
B-Relación P/AE	30,37	1	30,37	3,31	0,1117
A <sup>2</sup>	364,26	1	364,26	39,68	0,0004*
B <sup>2</sup>	238,77	1	238,77	26,01	0,0014*
Residuales	64,26	7	9,18		
Falta de ajuste	45,17	4	11,29	1,78	0,3326
Error puro	19,09	3	6,36		
Corr. Total	555,39	11			

\*: significativo

## Ecuación final

$$Y = -43,22602 + 2,78874 \text{ Temperatura} - 73,45000 \text{ Relación P/AE} - 0,009541 \text{ Temperatura}^2 + 9,46250 \text{ Relación P/AE}^2$$



Gráficos de diagnóstico

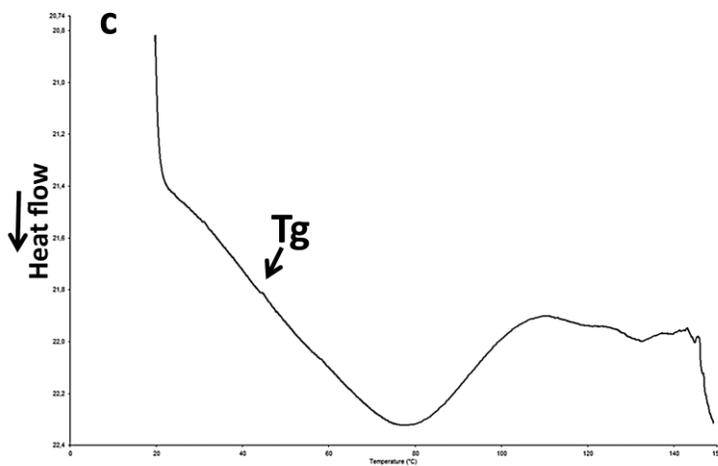
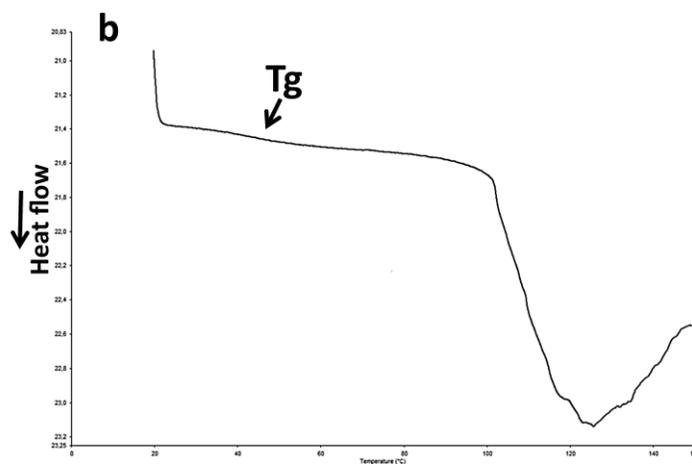
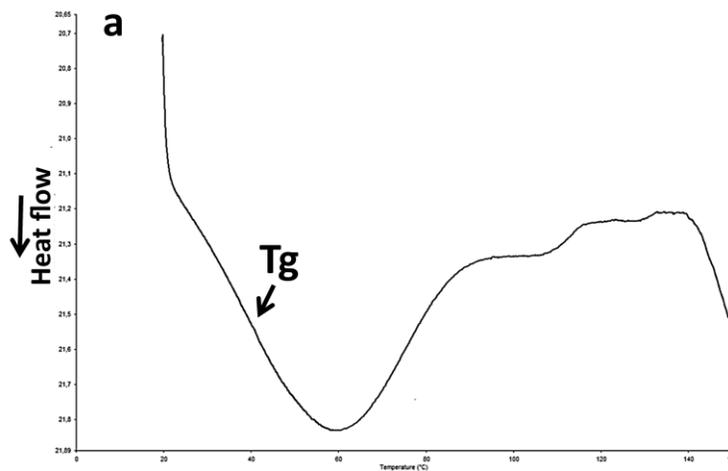
## Optimización múltiple

6 soluciones encontradas

Número	Temperatura	Relación P/AE	EE	Y	Deseabilidad
1*	123	3:1	92,801	20,324	0,620
2	123	3:1	92,853	20,168	0,620
3	112	5:1	92,066	18,972	0,548
4	112	5:1	92,186	18,584	0,547
5	113	5:1	91,926	19,424	0,547
6	111	5:1	92,333	18,110	0,547

\*: seleccionada

**Anexo IX.** Perfil de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las micropartículas de los sistemas P-MD (a), P-M (b) y P-M+MD (c) obtenidas a 150 °C y relación P/AE 3:1



**Anexo X.** Variación de los parámetros de color ( $C^*$ ,  $L^*$ ,  $h^\circ$  y  $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C

Variación de  $C^*$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	$C^*$	D.E.	Día	$C^*$	D.E.	Día	$C^*$	D.E.			
0	27,54	0,04	A b	0	24,11	0,09	C bc	0	25,67	0,02	B ab
7	25,50	0,06	A e	7	24,34	0,68	B bc	7	25,34	0,09	A b
14	28,24	0,16	A a	14	26,73	0,32	B a	14	26,16	0,14	C a
21	26,62	0,05	A c	21	24,71	0,62	B bc	21	25,31	0,36	B bc
35	26,97	0,34	A c	35	24,84	0,14	C b	35	25,77	0,4	B ab
49	26,06	0,14	A d	49	23,35	0,83	C c	49	24,66	0,23	B c

Variación de  $L^*$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	$L^*$	D.E.	Día	$L^*$	D.E.	Día	$L^*$	D.E.			
0	88,57	0,03	C a	0	91,99	0,08	A a	0	90,24	0,03	B a
7	84,56	0,2	B d	7	89,74	0,8	A c	7	88,91	0,24	A d
14	86,77	0,33	C c	14	91,08	0,01	A ab	14	89,92	0,43	B ab
21	87,04	0,02	B bc	21	89,00	0,19	A c	21	89,24	0,05	A cd
35	87,26	0,45	B bc	35	91,24	0,22	A ab	35	87,70	0,08	B e
49	87,78	0,44	C ab	49	90,87	0,14	A b	49	89,63	0,1	B bc

Variación de  $h^\circ$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C

P-M			P-MD			P-M+MD		
Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.
0	88,47	0,06	0	89,50	0,04	0	89,70	0,02
7	88,82	0,09	7	90,48	0,08	7	89,95	0,01
14	88,44	0,24	14	90,23	0,07	14	90,06	0,03
21	88,78	0,09	21	90,18	0,87	21	90,16	0,29
35	88,64	0,01	35	90,97	0,18	35	89,86	0,1
49	88,79	0,06	49	91,25	0,11	49	90,38	0,03

Cambio de color ( $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C

P-M			P-MD			P-M+MD		
Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.
0	0,05	0,05	0	0,087	0,05	0	0,029	0,01
7	4,50	0,21	7	2,393	0,67	7	1,383	0,22
14	1,94	0,25	14	2,79	0,31	14	0,67	0,3
21	1,79	0,04	21	3,117	0,11	21	1,13	0,1
35	1,49	0,26	35	1,23	0,18	35	2,57	0,09
49	1,71	0,33	49	1,63	0,49	49	1,223	0,24

P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); C\*: croma, L\*: luminosidad;  $h^\circ$ : ángulo de tono;  $\Delta E^*$ : cambio total de color. Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre sistemas en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada sistema.

**Anexo XI.** Variación de los parámetros de color ( $C^*$ ,  $L^*$ ,  $h^\circ$  y  $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C

Variación de  $C^*$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	$C^*$	D.E.	Día	$C^*$	D.E.	Día	$C^*$	D.E.			
0	27,54	0,04	A c	0	24,11	0,09	C d	0	25,67	0,02	B c
7	28,60	0,61	A c	7	24,96	1,4	B cd	7	26,53	0,58	AB c
14	35,22	1,01	A a	14	28,38	0,06	C a	14	31,41	0,74	B b
21	32,17	0,84	A b	21	26,23	0,4	B bc	21	31,69	0,3	A b
35	35,22	0,37	A a	35	27,22	0,04	C ab	35	33,00	0,11	B a
49	35,22	0,14	A a	49	26,53	0,12	C bc	49	32,12	0,11	B ab

Variación de  $L^*$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	$L^*$	D.E.	Día	$L^*$	D.E.	Día	$L^*$	D.E.			
0	88,57	0,03	C a	0	91,99	0,08	A a	0	90,24	0,03	B a
7	86,24	0,20	B b	7	88,88	1,01	A b	7	88,07	0,47	A a
14	82,02	0,43	B c	14	89,31	0,68	A b	14	83,56	1,72	B b
21	77,47	1,57	C d	21	87,16	0,23	A b	21	82,50	1,40	B b
35	75,58	1,00	C de	35	87,52	1,64	A b	35	81,36	1,78	B b
49	74,19	0,45	C e	49	89,00	0,03	A b	49	80,78	0,61	B b

Variación de  $h^\circ$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C

P-M			P-MD			P-M+MD		
Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.
0	88,47	0,06	0	89,50	0,04	0	89,70	0,02
7	88,25	0,12	7	89,52	0,41	7	89,87	0,39
14	86,60	0,06	14	88,02	0,22	14	87,67	0,61
21	85,86	0,62	21	88,70	0,51	21	87,59	0,47
35	84,23	0,56	35	87,88	0,49	35	87,18	0,62
49	83,64	0,21	49	88,48	0,16	49	86,85	0,36

Cambio de color ( $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C

P-M			P-MD			P-M+MD		
Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.
0	0,05	0,05	0	0,09	0,05	0	0,03	0,01
7	2,62	0,09	7	3,49	0,59	7	2,37	0,63
14	10,17	0,49	14	5,11	0,32	14	8,87	1,80
21	12,10	1,80	21	5,29	0,38	21	9,88	1,31
35	15,27	1,08	35	5,55	1,32	35	11,62	1,46
49	16,51	0,44	49	3,88	0,10	49	11,55	0,46

P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); C\*: croma, L\*: luminosidad;  $h^\circ$ : ángulo de tono;  $\Delta E^*$ : cambio total de color. Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre sistemas en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada sistema.

**Anexo XII.** Variación de los parámetros de color ( $C^*$ ,  $L^*$ ,  $h^\circ$  y  $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C

Variación de  $C^*$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	$C^*$	D.E.	Día	$C^*$	D.E.	Día	$C^*$	D.E.			
0	27,5	0,0	A f	0	24,1	0,1	C c	0	25,7	0,0	B d
7	31,4	0,1	A e	7	27,6	1,1	B b	7	30,7	1,0	A c
14	36,0	0,6	A b	14	30,0	0,2	B a	14	35,1	0,3	A a
21	33,7	0,2	A d	21	28,5	0,1	B b	21	34,3	1,1	A ab
35	34,8	0,3	A c	35	29,8	0,2	B a	35	34,5	0,3	A ab
49	32,8	0,2	A a	49	28,5	0,2	C b	49	34,1	0,8	B b

Variación de  $L^*$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	$L^*$	D.E.	Día	$L^*$	D.E.	Día	$L^*$	D.E.			
0	88,57	0,03	C a	0	91,99	0,08	A a	0	90,24	0,03	B a
7	78,10	0,94	B b	7	85,01	0,68	A c	7	80,23	1,37	B b
14	74,72	0,28	C c	14	87,07	0,24	A b	14	77,59	1,26	B c
21	73,52	0,06	C cd	21	85,04	0,47	A c	21	76,67	0,48	B cd
35	73,33	0,55	C d	35	84,26	0,16	A c	35	74,70	0,46	B d
49	71,01	0,03	C e	49	83,71	0,92	A c	49	74,56	0,04	B d

Variación de  $h^\circ$  durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C

P-M			P-MD			P-M+MD		
Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.
0	88,47	0,06	0	89,50	0,04	0	89,70	0,02
7	85,31	0,07	7	86,53	0,72	7	85,53	0,48
14	84,19	0,46	14	85,91	0,11	14	84,18	0,33
21	82,23	0,11	21	85,33	0,32	21	83,08	0,31
35	82,07	0,01	35	84,83	0,20	35	81,89	0,14
49	80,17	0,09	49	83,00	0,38	49	78,84	0,09

Cambio de color ( $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C

P-M			P-MD			P-M+MD		
Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.
0	0,03	0,01	0	0,09	0,05	0	0,05	0,05
7	13,61	0,78	7	7,92	1,13	7	9,07	1,66
14	18,86	0,61	14	7,89	0,04	14	13,53	0,85
21	18,93	0,14	21	8,43	0,45	21	14,00	0,97
35	19,62	0,36	35	9,88	0,24	35	15,92	0,26
49	20,91	0,19	49	9,87	0,72	49	17,75	0,08

P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); C\*: croma, L\*: luminosidad;  $h^\circ$ : ángulo de tono;  $\Delta E^*$ : cambio total de color. Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre sistemas en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada sistema.

**Anexo XIII.** Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD

Variación de la retención de indicaxantina durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	Ret.	D.E.	Día	Ret.	D.E.	Día	Ret.	D.E.			
0	100,0	0,2	A a	0	100,0	0,8	A a	0	100,0	0,1	A a
7	79,0	1,3	B c	7	101,0	0,75	A a	7	103,4	11,2	A a
14	88,4	1,45	A b	14	98,1	3,2	A a	14	98,3	8,0	A a
21	86,9	0,35	B b	21	100,4	3,25	AB a	21	102,4	9,65	A a
35	86,8	1,45	B b	35	103,9	3,25	A a	35	101,7	1,8	A a
49	88,2	0,7	B b	49	100,1	1,05	A a	49	100,9	2,55	A a

Variación de la concentración de indicaxantina durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 5 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	Conc.	D.E.	Día	Conc.	D.E.	Día	Conc.	D.E.			
0	19,83	0,04	A a	0	18,91	0,16	B a	0	14,92	0,01	C a
7	15,66	0,26	B c	7	19,10	0,14	A a	7	15,43	1,68	A a
14	17,53	0,29	A b	14	18,55	0,62	A a	14	14,67	1,20	B a
21	17,24	0,07	AB b	21	18,97	0,62	A a	21	15,27	1,45	B a
35	17,21	0,28	B b	35	19,65	0,62	A a	35	15,17	0,27	C a
49	17,49	0,14	B b	49	18,92	0,20	A a	49	15,05	0,38	C a

P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); Ret.: retención de indicaxantina (%); Conc.: concentración de indicaxantina (mg EI 100 g<sup>-1</sup>); letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre sistemas en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada sistema.

**Anexo XIV.** Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 37 °C de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD

Variación de la retención de indicaxantina durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C

P-M				P-MD				P-M+MD			
Día	Ret.	D.E.		Día	Ret.	D.E.		Día	Ret.	D.E.	
0	100,0	0,2	A a	0	100,0	0,8	A a	0	100,0	0,1	A a
7	72,2	0,35	C b	7	96,3	1,9	A a	7	83,5	2	B c
14	74,8	7,9	C b	14	106,8	4,7	A a	14	92,4	1,8	B b
21	62,5	0,35	C bc	21	101,8	0,005	A a	21	93,2	0,6	B b
35	58,7	1,95	B cd	35	101,2	6,4	A a	35	95,2	0,25	A b
49	48,8	7,45	B d	49	99,2	4,8	A a	49	95,8	1,25	A b

Variación de la concentración de indicaxantina durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 37 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	Conc.	D.E.	Día	Conc.	D.E.	Día	Conc.	D.E.			
0	19,83	0,04	A a	0	18,91	0,16	B a	0	14,92	0,01	C a
7	14,31	0,07	B b	7	18,21	0,36	A c	7	12,47	0,3	C a
14	14,83	1,58	B b	14	20,20	0,89	A b	14	13,79	0,27	B a
21	12,40	0,07	C bc	21	19,24	0,001	A b	21	13,9	0,09	B a
35	11,65	0,38	C cd	35	19,13	1,2	A b	35	14,2	0,04	B a
49	9,67	1,48	C d	49	18,76	0,9	A b	49	14,29	0,19	B a

P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); Ret.: retención de indicaxantina (%); Conc.: concentración de indicaxantina (mg EI 100 g<sup>-1</sup>); letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre sistemas en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada sistema.

**Anexo XV.** Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 60 °C de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD

Variación de la retención de indicaxantina durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	Ret.	D.E.	Día	Ret.	D.E.	Día	Ret.	D.E.			
0	100,0	0,2	A a	0	100,0	0,8	A a	0	100,0	0,1	A a
7	60,7	2,95	C b	7	96,5	2,2	A ab	7	78,6	4,4	B b
14	43,9	0,6	C c	14	96,5	2,2	A ab	14	64,6	0,6	B c
21	36,5	3,7	C d	21	93,7	0,85	A b	21	60,6	4,1	B c
35	34,9	1,9	C d	35	92,7	2,35	A bc	35	58,6	1,05	B c
49	31,8	1,7	C d	49	89,0	0,35	A c	49	60,5	4,55	B c

Variación de la concentración de indicaxantina durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas P-MD, P-M y P-M+MD a 60 °C

P-M			P-MD			P-M+MD					
Día	Conc.	D.E.	Día	Conc.	D.E.	Día	Conc.	D.E.			
0	14,92	0,010	C a	0	18,91	0,160	B a	0	19,83	0,040	A a
7	9,05	0,440	C b	7	18,24	0,420	A ab	7	15,59	0,870	B b
14	6,55	0,090	C c	14	18,25	0,420	A ab	14	12,82	0,120	B c
21	5,45	0,560	C d	21	17,71	0,160	A b	21	12,02	0,820	B c
35	5,21	0,280	C d	35	17,52	0,450	A bc	35	11,63	0,220	B c
49	4,75	0,260	C d	49	16,83	0,070	A c	49	11,99	0,910	B c

P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); Ret.: retención de indicaxantina (%); Conc.: concentración de indicaxantina (mg EI 100 g<sup>-1</sup>); letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre sistemas en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada sistema.

**Anexo XVI.** Variación de los parámetros de color ( $C^*$ ,  $L^*$ ,  $h^\circ$  y  $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el yogur comercial de vainilla

Variación de  $C^*$  durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el yogur comercial de vainilla

Y-P-MD				Y-P-M+MD				Y-Comercial			
Día	$C^*$	D.E.		Día	$C^*$	D.E.		Día	$C^*$	D.E.	
0	12,40	0,06	B b	0	11,92	0,02	C a	0	13,03	0,06	A c
7	12,21	0,01	B c	7	11,85	0,10	C a	7	13,50	0,02	A b
14	12,47	0,05	B b	14	11,79	0,02	C a	14	13,80	0,02	A a
28	12,59	0,01	B a	28	11,88	0,01	C a	28	13,83	0,02	A a

Variación de  $L^*$  durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el yogur comercial de vainilla

Y-P-MD				Y-P-M+MD				Y-Comercial			
Día	$L^*$	D.E.		Día	$L^*$	D.E.		Día	$L^*$	D.E.	
0	87,16	0,02	A b	0	87,25	0,08	A b	0	87,27	0,03	A a
7	87,73	0,03	A a	7	87,26	0,02	B b	7	87,24	0,02	B a
14	87,41	0,08	A b	14	87,53	0,10	A a	14	87,12	0,03	B b
28	87,35	0,19	AB b	28	87,67	0,14	A a	28	87,27	0,03	B a

Variación de  $h^\circ$  durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el yogur comercial de vainilla

Y-P-MD			Y-P-M+MD			Y-Comercial					
Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.	Día	$h^\circ$	D.E.			
0	88,53	0,51	C c	0	90,67	0,01	B d	0	104,32	0,12	A a
7	89,37	0,00	C b	7	91,06	0,07	B c	7	103,69	0,04	A b
14	90,36	0,06	C a	14	91,76	0,14	B b	14	103,50	0,12	A b
28	90,96	0,06	C a	28	92,42	0,06	B a	28	103,49	0,01	A b

Cambio de color ( $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el yogur comercial de vainilla

Y-P-MD			Y-P-M+MD			Y-Comercial					
Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.	Día	$\Delta E^*$	D.E.			
0	0,13	0,00	A c	0	0,08	0,001	B c	0	0,06	0,02	B c
7	0,62	0,02	A a	7	0,12	0,05	C c	7	0,50	0,02	B b
14	0,48	0,04	B b	14	0,39	0,04	B b	14	0,81	0,03	A a
28	0,61	0,07	B a	28	0,56	0,10	B a	28	0,82	0,02	A a

P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); C\*: croma, L\*: luminosidad;  $h^\circ$ : ángulo de tono;  $\Delta E^*$ : cambio total de color. Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre alimentos en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada alimento.

**Anexo XVII.** Variación de los parámetros de color ( $C^*$ ,  $L^*$ ,  $h^\circ$  y  $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento a 5 °C de la bebida refrescante con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el agua saborizada de pera

Variación de  $C^*$  durante el almacenamiento a 5 °C de la bebida refrescante con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el agua saborizada de pera

<b>B-P-MD</b>			<b>B-P-M+MD</b>			<b>B-Comercial</b>					
<b>Día</b>	<b><math>C^*</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>C^*</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>C^*</math></b>	<b>D.E.</b>			
0	7,07	0,01	A a	0	6,77	0,02	B a	0	4,26	0,01	C a
7	5,60	0,25	A b	7	5,60	0,05	A b	7	4,67	0,35	B a
14	4,50	0,10	A c	14	3,78	0,31	B c	14	4,58	0,01	A a
28	1,95	0,10	B d	28	1,93	0,03	B d	28	4,35	0,16	A a

Variación de  $L^*$  durante el almacenamiento a 5 °C de la bebida refrescante con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el agua saborizada de pera

<b>B-P-MD</b>			<b>B-P-M+MD</b>			<b>B-Comercial</b>					
<b>Día</b>	<b><math>L^*</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>L^*</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>L^*</math></b>	<b>D.E.</b>			
0	94,39	0,06	B d	0	93,85	0,01	C c	0	96,06	0,03	A a
7	96,24	0,11	A b	7	95,79	0,24	A ab	7	96,22	0,51	A a
14	95,57	0,01	A c	14	95,46	0,49	A b	14	95,94	0,05	A a
28	96,78	0,07	A a	28	96,23	0,08	B a	28	96,20	0,01	B a

Variación de  $h^\circ$  durante el almacenamiento a 5 °C de la bebida refrescante con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el agua saborizada de pera

<b>B-P-MD</b>			<b>B-P-M+MD</b>			<b>B-Comercial</b>					
<b>Día</b>	<b><math>h^\circ</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>h^\circ</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>h^\circ</math></b>	<b>D.E.</b>			
0	87,92	0,01	C b	0	89,23	0,06	B c	0	97,86	0,13	A a
7	88,25	0,39	C b	7	90,01	0,06	B c	7	97,96	0,30	A a
14	89,94	0,26	C b	14	91,52	0,73	B b	14	97,48	0,002	A a
28	96,78	2,80	A a	28	96,76	0,13	A a	28	98,03	0,38	A a

Cambio de color ( $\Delta E^*$ ) durante el almacenamiento a 5 °C de la bebida refrescante con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD y el agua saborizada de pera

<b>B-P-MD</b>			<b>B-P-M+MD</b>			<b>B-Comercial</b>					
<b>Día</b>	<b><math>\Delta E^*</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>\Delta E^*</math></b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b><math>\Delta E^*</math></b>	<b>D.E.</b>			
0	0,04	0,03	A d	0	0,02	0,02	A d	0	0,02	0,01	A c
7	2,36	0,23	A c	7	2,27	0,23	A c	7	0,64	0,22	B a
14	2,83	0,09	A b	14	3,42	0,50	A b	14	0,35	0,03	B ab
28	5,68	0,08	A a	28	5,42	0,05	B a	28	0,20	0,08	C bc

B: bebida; Y: yogur; P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); C\*: croma, L\*: luminosidad;  $h^\circ$ : ángulo de tono;  $\Delta E^*$ : cambio total de color. Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre alimentos en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada alimento.

**Anexo XVIII.** Variación de la concentración y la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C de los alimentos con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD

Variación de la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD

Y-P-MD			Y-P-M+MD				
Día	Ret.	D.E.	Día	Ret.	D.E.		
0	100,00	6,09	A a	0	100,00	5,40	A a
7	99,53	2,47	A a	7	98,17	0,21	A a
14	93,59	0,31	A a	14	96,18	3,34	A a
28	83,41	1,81	A b	28	82,01	0,30	A b

Variación de la concentración de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C del yogur con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD

Y-P-MD			Y-P-M+MD				
Día	Conc.	D.E.	Día	Conc.	D.E.		
0	0,065	0,004	A a	0	0,060	0,003	A a
7	0,065	0,002	A a	7	0,060	0,000	B a
14	0,061	0,000	A a	14	0,060	0,002	B a
28	0,054	0,001	A b	28	0,050	0,001	B b

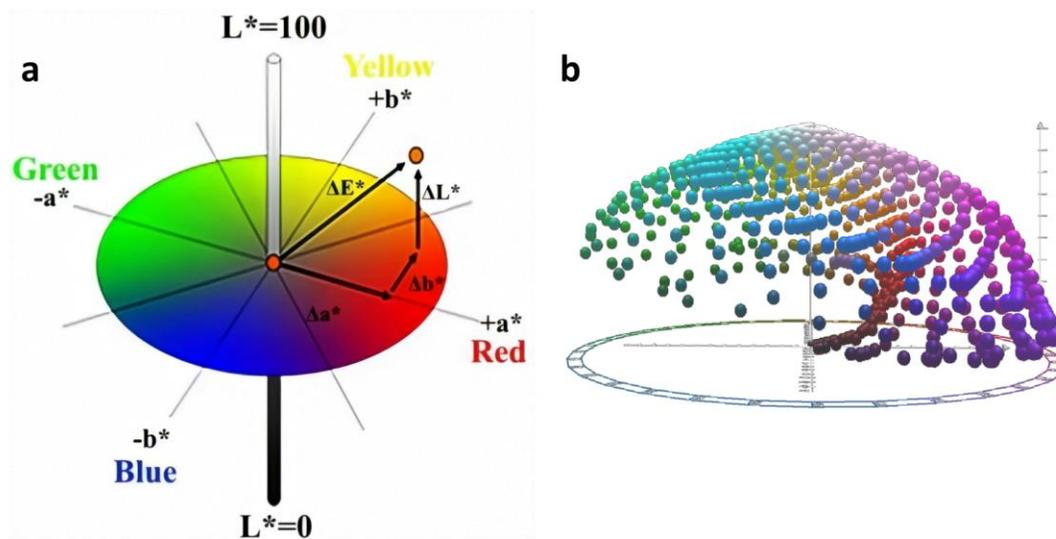
Variación de la retención de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C de las bebidas refrescantes con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD

<b>B-P-MD</b>			<b>B-P-M+MD</b>				
<b>Día</b>	<b>Ret.</b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b>Ret.</b>	<b>D.E.</b>		
0	100,00	2,45	A a	0	100,00	1,87	A a
7	85,99	2,91	A b	7	87,81	1,30	A b
14	62,55	4,29	A c	14	46,51	7,91	B c
28	11,96	1,02	A d	28	7,44	0,17	B d

Variación de la concentración de indicaxantina durante el almacenamiento a 5 °C de las bebidas refrescantes con las micropartículas colorantes P-MD y P-M+MD

<b>B-P-MD</b>			<b>B-P-M+MD</b>				
<b>Día</b>	<b>Conc.</b>	<b>D.E.</b>	<b>Día</b>	<b>Conc.</b>	<b>D.E.</b>		
0	0,58	0,01	A a	0	0,47	0,01	B a
7	0,50	0,02	A b	7	0,41	0,01	B b
14	0,36	0,02	A c	14	0,22	0,04	B c
28	0,07	0,01	A d	28	0,03	0,001	B d

B: bebida; Y: yogur; P: pulpa de tuna anaranjada; M: mucílago; MD: maltodextrina, D.E.: desviación estándar (n=3); Ret.: retención de indicaxantina (%); Conc.: concentración de indicaxantina (mg EI 100 g<sup>-1</sup>); letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa entre alimentos en cada día y letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre días en cada alimento.

**Anexo XIX.** Representación esquemática del espacio de color

Esquema de representación del color. Componentes  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$  y variación de color  $\Delta E^*$  (Dao *et al.*, 2018)(a), espacio de color CIELAB (Everding, 2015)(b).