



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRICOLAS
CAMPUS CORDOBA**

POSGRADO EN INNOVACION AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS
MICROENCAPSULADAS DE *Ardisia
compressa* K. EN UNA BEBIDA ISOTÓNICA**

MARIA VIANEY ANTONIO GÓMEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

AMATLAN DE LOS REYES, VERACRUZ, MEXICO.

2 0 1 5

**ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS
MICROENCAPSULADAS DE *Ardisia
compressa* K. EN UNA BEBIDA
ISOTÓNICA.**

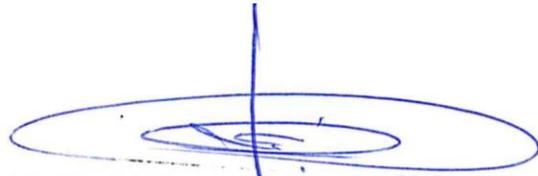
La presente tesis, titulada: **Estabilidad de las antocianinas microencapsuladas de *Ardisia compressa* K. en una bebida isotónica**, realizada por la alumna: **María Vianey Antonio Gómez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

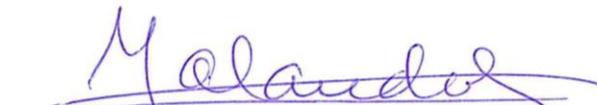
CONSEJO PARTÍCULAR

CONSEJERO:



DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

ASESORA:



DRA. YOLANDA SALINAS MORENO

ASESORA:



DRA. ADRIANA CONTRERAS OLIVA

ASESOR:



DR. JOSÉ ANDRÉS HERRERA CORREDOR

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, 12 de Noviembre del 2015

ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS MICROENCAPSULADAS DE *Ardisia compressa* K. EN UNA BEBIDA ISOTÓNICA

Maria Vianey Antonio Gómez, Ing.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Recientemente, el interés en el uso potencial de las antocianinas como colorante natural ha aumentado. Las antocianinas no sólo confieren color a los alimentos que los contienen, sino que también aportan beneficios a la salud. Sin embargo, su incorporación en matrices de alimentos procesados está limitada, debido a que son sensibles a las condiciones ambientales. Chagalapoli es el fruto de *Ardisia compressa* K. con un elevado contenido de antocianinas. En el presente trabajo, en primer lugar se realizó la optimización de la extracción de las antocianinas del chagalapoli mediante la metodología de superficie respuesta. Los factores probados en la extracción fueron concentración de etanol, pH y tiempo de sonicado, de estas variables únicamente la concentración de etanol y el pH fueron significativas ($p \leq 0.05$). Las mejores condiciones de extracción fueron con etanol al 63.5%, un pH de 2 y un tiempo de sonicado de 30 min, con una relación pulpa de fruto:solvente de 1:5 (p/v). Bajo las condiciones optimizadas se obtuvieron 1545.45 ± 16.34 mg equivalentes de Mv3gal/100 g de tejido fresco. Posteriormente, se llevó a cabo la encapsulación de las antocianinas mediante secado por aspersión. Los materiales de pared utilizados fueron maltodextrinas (MD) y Capsul® (CA). La mezcla de MD y CA (50:50 p/p) fue la que obtuvo los mejores resultados de eficiencia de encapsulación (99%) y retención de antocianinas (95%). Las variables de higroscopicidad (11.48g/100g), contenido de humedad (2.47%), actividad de agua (0.13) y tiempo de vida media (501.6 días) de las microcápsulas obtenidas son favorables para la conservación y almacenamiento de las antocianinas. Por último, las microcápsulas elaboradas con una mezcla de MD y CA (25:75 p/p) fueron incorporadas en una bebida isotónica para evaluar su estabilidad durante 42 días almacenadas a 4°C y 25°C en ausencia de luz. La estabilidad de las antocianinas (k , $t_{1/2}$ y RA) fue afectada significativamente ($p < 0.0001$) por la temperatura, a 4°C la bebida con microcápsulas mostró mejor estabilidad ($k = 0.00011$, $t_{1/2} = 6019.5$ hrs y RA = 91.2 %) y menor diferencia de color (3.81). Los resultados de esta investigación muestran que las antocianinas del chagalapoli representan una fuente potencial de pigmentos naturales para su aplicación en la industria de alimentos.

ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS MICROENCAPSULADAS DE *Ardisia compressa* K. EN UNA BEBIDA ISOTÓNICA

Maria Vianey Antonio Gómez, Ing.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Interest in the potential use of anthocyanins as natural colorant has increased recently. Anthocyanins not only provide color to foods that contain them, but also provide health benefits. However, incorporation in processed food matrices is limited, because they are sensitive to environmental conditions. Chagalapoli is the fruit of *Ardisia compressa* K. with a high content of anthocyanins. In this paper, first optimization extracting anthocyanins chagalapoli was performed by response surface methodology. The factors were tested at the rate of ethanol concentration, pH and sonication time, these variables only the ethanol concentration and pH were significant ($p \leq 0.05$). The best conditions with ethanol extraction were 63.5%, a pH of 2 and a time of 30 min, sonicated with a ratio of fruit pulp: solvent 1:5 (w/v). Under optimized conditions, 1545.45 ± 16.34 mg malvidin-3-galactoside (Mv3gal) equivalent/100 g fresh tissue was obtained. Subsequently it conducted anthocyanins encapsulation by spray drying. Wall materials used were maltodextrin (MD) and Capsul ® (CA). The mix of MD and CA (50:50 w/w) was that obtained the best results in encapsulation efficiency (99%) and retention of anthocyanins (95%). Hygroscopicity variables (11.48g/100g), moisture content (2.47%), water activity (0.13) and half-life (501.6 days) of the microcapsules obtained are favorable for the preservation and storage of anthocyanins. Finally, the microcapsules prepared with a mixture of MD and CA (25:75 w/w) were incorporated in a isotonic drink to evaluate its stability for 42 days stored at 4 °C and 25 °C in absence of light. The stability of anthocyanins (k, $t_{1/2}$ and RA) was affected significantly ($p < 0.0001$) for the temperature, at 4 °C the drink with microcapsules showed better stability (k = 0.00011, $t_{1/2} = 6019.5$ hrs and RA = 91.2%) and less color difference (3.81). The results of this research show that anthocyanins chagalapololi represent a potential source of natural pigments for use in food industry.

Keywords: spray drying, extraction, response surface methodology, stability.

DEDICATORIA

Le dedico esta victoria a Dios quien me da salud y fortaleza para cumplir mis metas y sueños.

A mis padres, Gerardo Antonio Crivelli y Maribel Gómez Álvarez por darme la vida.

A mi esposo, Amalio Alonso por su apoyo, motivación, paciencia y comprensión.

A mis hermanos y hermanas, por esos momentos de comprensión en que no pude acompañarlos y por su apoyo en esta etapa.

Y al hermoso ser que está dentro de mí por darme la felicidad de ser madre e impulsarme a concluir este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A mi consejo, Dr. Francisco Hernández Rosas, Dra. Yolanda Salinas Moreno, Dra. Adriana Contreras Oliva y Dr. José Andrés Herrera Corredor, por orientarme en este trayecto y por sus conocimientos compartidos.

Al Dr. Fernando Martínez Bustos por su asesoría incondicional para la etapa de la microencapsulación de este proyecto.

A los auxiliares de los laboratorios del CINVESTAV Querétaro quienes me apoyaron en los experimentos realizados para la microencapsulación: M.C. José Juan Veles Medina, M.C. Verónica Flores Casamayor, Ing. Eleazar Urbina Álvarez e Ing. Adair Jiménez Nieto. Muchas Gracias.

Agradezco al Jefe de campo MC. Ramón Hernández Virgen y todo el personal del INIFAP de Los Altos Jalisco, por brindarme las instalaciones y las facilidades para realización del presente.

A mis compañeros de la segunda generación de IAS por el conocimiento compartido y un agradecimiento especial a Chely, Sonia, Susan, Eutikio, Manuel y José Peña por su apoyo y experiencias compartidas.

A mis amigos y compañeros Hugo, Edgardo y Enrique por su apoyo en esos días intensos de trabajo en el laboratorio INIFAP.

A la Microrregión de Atención Prioritaria-Centro por el apoyo y facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme los conocimientos necesarios y el apoyo otorgado en este proyecto.

Por último agradezco a CONACYT por la beca otorgada para continuar mis estudios de maestría.

CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Publicaciones.....	3
1.2 Participación en congresos	3
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Objetivos	3
1.5 Referencias	4
CAPITULO II. ESTADO DEL ARTE	7
2.1 Características del fruto de chagalapoli	7
2.2 Antocianinas.....	9
2.2.1 Estructura química de las Antocianinas.....	10
2.2.2 Antocianinas en frutillas.....	11
2.2.3 Importancia de las antocianinas como colorantes	12
2.2.4 Factores químicos que afectan a la estabilidad de las antocianinas	13
2.3 Extracción de antocianinas.....	16
2.4 Microencapsulación	18
2.4.1 Secado por aspersión	19
2.4.2 Materiales de pared empleados en la encapsulación de antocianinas	20
2.5 Estabilidad en antocianinas microencapsuladas.....	27
2.5.1 Cinética de degradación de las antocianinas	28
2.6 Aplicación de antocianinas en alimentos	28
2.7 Referencias	30
CAPÍTULO III. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE CHAGALAPOLI (<i>Ardisia Compressa</i> K.) Y MICROENCAPSULACIÓN CON MALTODEXTRINA Y CAPSUL®.....	38
3.1 INTRODUCCIÓN	40
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
3.4 CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO IV. ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS MICROENCAPSULADAS DEL CHAGALAPOLI (<i>Ardisia compressa</i> k.) EN UNA BEBIDA ISOTÓNICA.....	61

4.1 INTRODUCCIÓN	63
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	64
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
4.4 CONCLUSIONES	78
CAPÍTULO V. ESTABILIDAD DE LOS POLVOS EN EL ALMACENAMIENTO.....	81
5.1 INTRODUCCIÓN	81
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
5.4 CONCLUSIONES.....	89
5.5 REFERENCIAS	89
CONCLUSIONES GENERALES.....	91
ANEXOS	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del fruto de chagalapoli	9
Tabla 2. Distribución de antocianinas comunes en frutillas	12
Tabla 3. Condiciones de operación y materiales de pared utilizados en la microencapsulación de antocianinas por secado por aspersión.	22
Tabla 4. Activos encapsulados con Capsul.....	27
Tabla 5. Aplicación de antocianinas en alimentos.....	30
Tabla 6. Variables independientes de proceso, rango y niveles utilizados para el diseño de Box-Behnken.....	42
Tabla 7. Condiciones experimentales y contenido de antocianinas totales para la extracción de antocianinas en el fruto de ACK, utilizando un diseño Box-Behnken.....	46
Tabla 8. Análisis de varianza de las variables de proceso como términos lineal, cuadrático y sus interacciones de la optimización del proceso de extracción de antocianinas.....	48
Tabla 9. Características fisicoquímicas de las microcápsulas de chagalapoli obtenidas con diferentes mezclas de maltodextrina: Capsul.....	52
Tabla 10. Parámetros cinéticos de degradación de las antocianinas encapsuladas y no encapsuladas en una bebida isotónica almacenadas a 4 °C y 25 °C en ausencia de luz.	69
Tabla 11. Estabilidad de los valores L, Croma y Hue de las bebidas isotónicas durante su almacenamiento.....	73
Tabla 12. Contenido de antocianinas presentes en las bebidas al inicio y al final del periodo de almacenamiento, determinado por HPLC y antocianinas totales por espectrofotometría.	77

Tabla 13. Parámetros cinéticos de degradación de las antocianinas encapsuladas almacenadas a 35°C en ausencia de luz durante 10 semanas.	84
Tabla 14. Contenido de antocianinas en las microcápsulas determinadas por HPLC de los diferentes tratamientos almacenados durante 10 semanas a 35°C en ausencia de luz.	88
Tabla 15. Resultados de solubilidad de las microcápsulas	92
Tabla 16. Preparación de curva patrón para espectrofotómetro.....	95
Tabla 17. Preparación de curva patrón para HPLC	96
Tabla 18. Análisis ANOVA de parámetros cinéticos de degradación en la evaluación de las bebidas con microcápsulas y con extracto	97
Tabla 19. Análisis de Correlación de Pearson para las variables evaluadas en las bebidas.	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flores, frutos y semillas de chagalapoli (<i>Ardisia compressa</i> K.). a) flores, b) racimo de frutos inmaduros, c) frutos maduros, d) corte transversal de un fruto maduro, y e) semillas (fuente: propia).....	8
Figura 2. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001)	10
Figura 3. Formas químicas de antocianinas dependiendo de la reacción de pH y la degradación de antocianinas. Donde R1 = H o sacárido, R2 y R3 = H o metilo (Castañeda-Ovando et al. 2009).....	14
Figura 4. Mecanismo de degradación de antocianinas. a) Reacción general, b) Reacción de degradación de Cianidina 3-glucosido (Sadilova et al., 2006).....	15
Figura 5. Diagrama del Secador por Aspersión Lab-Plan SD-03.....	19
Figura 6. Estructura química de maltodextrinas	24
Figura 7. Esterificación del almidón con 1-octenil-anhídrido succínico	26
Figura 8. Superficie de respuesta estimada de la extracción de antocianinas. A) Relación entre el pH y etanol con un tiempo fijo de sonicado de 20 min, (B) la relación entre el pH y tiempo de sonicado con una concentración fija de etanol al 75% y (C) relación entre la concentración de etanol y el tiempo de sonicado con un pH fijo de 2.5.....	49
Figura 9. Cromatograma del extracto etanólico de fruto fresco de chagalapoli obtenido por HPLC	51
Figura 10. Estructura externa de microcápsulas de antocianinas producidas a partir de diferentes combinaciones de materiales de pared: MC1000: Maltodextrina, MC7525: Maltodextrina- Capsul (75:25), MC5050: Maltodextrina-Capsul (50:50), MC2575: Maltodextrina-Capsul (25:75), y MC0100: Capsul.....	55
Figura 11. Cinética de degradación del extracto de antocianinas y antocianinas encapsuladas con Maltodextrina: Capsul (25:75) en una bebida isotónica sometida a 4 °C y 25 °C. BM4: bebida con microcápsulas a 4 °C; BM4: bebida con extracto microcápsulas a 25 °C; BE4: bebida con extracto a 4 °C; BE25: bebida con extracto a 25 °C.....	68
Figura 12. Contenido de sólidos en las bebidas isotónicas con antocianinas microencapsuladas (BM4 y BM25) y con extracto líquido (BE4 y BE25) almacenadas durante 42 días. .	71
Figura 13. Diferencia de color en las bebidas a los 42 días de almacenamiento. Bebida con microcápsulas a 4 °C (BM4) y a 25 °C (BM25); bebida con extracto a 4 °C (BE4) y a 25 °C (BE25).....	74

Figura 14. Cromatograma de microcápsulas de antocianinas de chagalapoli obtenido por HPLC e identificación de antocianinas.	75
Figura 15. Cromatogramas de la bebida con antocianinas microencapsuladas (A) y bebida con extracto de antocianinas (B) que muestran el perfil de las antocianinas en el día 0 y después de 42 días a 4 y 25 °C.	76
Figura 16. Degradación cinética de las antocianinas encapsuladas en almacenamiento a 35 °C en ausencia de luz. Tratamientos MC1000: 100% Maltodextrina, MC7525: 75% maltodextrina-25% Capsul, MC5050: 50% maltodextrina-50% Capsul, MC2575: 25% maltodextrina-75% Capsul.	83
Figura 17. Cromatogramas de microcápsulas de antocianinas evaluadas en la semana 0 y semana 10 de almacenamiento.	87
Figura 18. Color expresado en nanómetros de las micropartículas al inicio y final del periodo de almacenamiento bajo condiciones de ausencia de luz y 35°C.	88
Figura 19. Distribución de tamaño de micropartículas. (A) Maltodextrina:Capsul (100:00), (B) Maltodextrina:Capsul (75:25), (C) Maltodextrina:Capsul (50:50), (D) Maltodextrina:Capsul (25:75), (E) Malodextrina:Capsul (00:100).	93
Figura 20. Polvos obtenidos por secado por aspersión. MDX: maltodextrina, CA: Capsul.	94
Figura 21. Características físicas de las microcápsulas al día 0 y al día 7 en la prueba de higroscopicidad.	94
Figura 22. Curva de calibración de malvidina-3-galactosido realizada en el espectrofotómetro UV-visivle (Perkin Helmer, modelo Lambda 25) de INIFAP Centro Altos de Jalisco.	95
Figura 23. Curva de calibración de malvidina-3-galactosido obtenida en HPLC (Perkin-Elmer® Series 200) de INIFAP Centro Altos de Jalisco.	96

Lista de Abreviaturas

Mv3gal: Malvidina-3-O-galactosido
Mv3G: Malvidina-3-O-glucosido
Cy3G: Cianidina-3-O-glucosido
Df-3-o-gal: delfinidina 3-o-galactosido
Mv-di-o-hex: Malvidina-di-o-hexosido
Cy-3-o-gal: Cianidina 3-o-galactosido
Df-3-o-ara: Delfinidina-3-o-galactosido
Pt-3-o-gal: Petunidina-3-o-galactosido
Cy-3-o-ara: Cianidina-3-o-arabinosido
Pn-3-o-gal: Peonidina-3-o-galactosido
Pt-3-o-ara: Petunidina-3-O-arabinosido
Mv-3-o-galactosido:
GAE: Equivalentes de ácido gálico
MD: Maltodextrinas
CA: Capsul
MC1000: Maltodextrina 100%-Capsul 0%
MC7525: Maltodextrina 75%-Capsul 25%
MC5050: Maltodextrina 50%-Capsul 50%
MC2575: Maltodextrina 25%-Capsul 75%
MC0100: Capsul 100%-Maltodextrina 0%
AR: Retención de antocianinas en secado por aspersión
EE: Eficiencia de encapsulación
S: Solubilidad
TAC: Contenido de antocianinas totales
RA: Porcentaje de retención de antocianinas
BM: Bebida con microcápsulas
BM4: Bebida con microcápsulas a 4°C
BM25: Bebida con microcápsulas a 25 °C
BE: Bebida con extracto
BE4: Bebida con extracto a 4°C
BE25: Bebida con extracto a 25°C
 $t_{1/2}$: tiempo de vida media
 k : constante de velocidad de reacción
 L^* : luminosidad
hue: Angulo de tono
 C^* : Cromaticidad

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Chagalapoli es un fruto de la planta *Ardisia compressa* K. con un elevado contenido de antocianinas y alta actividad antioxidante (Joaquin-Cruz *et al.*, 2015), se consume en la región de los Tuxtlas como fruta fresca, en atoles, licores, helados (Lascurain *et al.*, 2010), bebidas refrescantes y dulces (Joaquin-Cruz *et al.*, 2015). Recientemente, ha aumentado el interés por el uso de las antocianinas como colorantes naturales debido a que no solo confieren color a los alimentos, sino que también se reporta que presentan actividad antioxidante, vasoprotectiva, antiinflamatoria, anticancerígena, antiobesidad y contrarresta la diabetes (Rojo *et al.*, 2012; Shih *et al.*, 2010).

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que pertenecen a los flavonoides (Giusti y Wrolstad, 2003) y representan una alternativa para la sustitución de los colorantes sintéticos con las tonalidades rosa salmón, rojo, azul y púrpura. Sin embargo para su aprovechamiento es importante optimizar las condiciones de la extracción para maximizar la recuperación del pigmento, minimizar su degradación y mejorar la rentabilidad de la extracción. Las condiciones más estudiadas en el proceso de extracción de antocianinas son: proporción sólido: solvente (Fan *et al.*, 2008, Pedro *et al.*, 2016), tipo de solvente, temperatura de extracción (Ghafoor *et al.*, 2011), tiempo de extracción (Lapornik *et al.*, 2005, Pedro *et al.*, 2016) y pH (Rodrigues *et al.*, 2015, Burin *et al.*, 2011); tales estudios están asociados con las inestabilidad de las antocianinas.

La estabilidad de las antocianinas depende de factores tales como: su estructura molecular, el pH, la temperatura elevada, la luz, la presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, oxígeno, ácido ascórbico, azúcares, entre otros (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011), lo que limita su uso en alimentos. Una alternativa para mejorar la estabilidad de las antocianinas es la microencapsulación mediante secado por aspersión (Cavalcanti *et al.*, 2011). Esta tecnología ha sido la más utilizada en la industria alimentaria (Murua-Pagola *et al.*, 2009) y consiste en el aislamiento de sustancias activas para la obtención de microcápsulas de forma esférica y tamaño micrométrico en las cuales, el material activo está protegido del medio ambiente por un material de pared (Nesterenko *et al.*, 2013). En este proceso es importante la selección de un material de pared adecuado para la estabilidad de las antocianinas.

Varios agentes encapsulantes se han utilizado en la microencapsulación por secado por aspersión, tales como: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas);

gomas (arábica, mezquite, acacia, alginato de sodio), proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos) y mezcla de ellos (Davidov-Pardo *et al.*, 2013). En particular, los materiales de pared empleados en la microencapsulación por secado por aspersion deben ser emulsificables, con alta solubilidad, baja viscosidad a altas concentración de sólidos y baja higroscopicidad (Loksuwan, 2007). Sin embargo, es imposible que un solo material presente todas estas propiedades; por lo tanto, a menudo se utiliza una mezcla de dos o más componentes (Silva *et al.*, 2013). Las maltodextrinas son de los materiales más comunes debido a su alta solubilidad y baja viscosidad (Tonon *et al.*, 2010). Por otro lado, los almidones modificados han mostrado buenas propiedades de encapsulación (Spada *et al.*, 2012), tales como el Capsul que es un almidón modificado químicamente mediante la incorporación de un componente lipofílico (succinato de octenilo) y promueve una excelente estabilidad y capacidad para emulsionar (Rocha *et al.*, 2012). El Capsul ha sido utilizado para encapsular compuestos bioactivos de baja polaridad tales como vitamina E (Hategekirnana *et al.*, 2015), licopeno (Rocha *et al.*, 2012), aceite de linaza (Carneiro *et al.*, 2013), aceite de café verde (Silva *et al.*, 2014) y mezcla de aceites esenciales de trigo, linaza y tocoferol (Domian *et al.*, 2015), pero no existen reportes de su uso en antocianinas, por lo que en el presente se estudiará su comportamiento en combinación con maltodextrinas.

Para la aplicación de antocianinas en alimentos, se requiere estabilidad en el color durante largos periodos (Galaffu *et al.*, 2015), por ejemplo, en los refrescos se requiere una vida útil de 9 meses (Boyer y McKinney, 2011). Las antocianinas encapsuladas en lugar de extractos antocianicos puede aumentar su estabilidad, por ello alimentos tales como: refresco isotónico (Burin *et al.*, 2011, Arrazola *et al.*, 2014b) y helados (Cam *et al.*, 2014) han sido estudiados en la aplicación de antocianinas, obteniendo resultados interesantes.

El presente trabajo tiene como objetivo principal microencapsular las antocianinas del chagalapoli e incorporarlas en una bebida isotónica para evaluar su estabilidad durante el almacenamiento. Para esto se realizó la optimización del proceso de extracción mediante la metodología de superficie respuesta, evaluando los factores pH, concentración de etanol y tiempo de sonicado. Después de esto, se encapsularon las antocianinas por secado por aspersion utilizando maltodextrinas y Capsul como materiales de pared. Las microcápsulas fueron caracterizadas fisicoquímica y morfológicamente con el fin de obtener las mejores eficiencias de encapsulación y con características que permitan mejorar su estabilidad en el almacenamiento. Por último, las microcápsulas fueron introducidas en una bebida isotónica para evaluar su estabilidad en términos

de color, tiempo de vida media y retención de antocianinas después de un periodo de almacenamiento de 42 días a temperaturas de 4°C y 25°C, en ausencia de luz.

1.1 Publicaciones

Antonio-Gómez, M. V., Salinas-Moreno, Y., Martínez-Bustos, F. & Hernández-Rosas, F. Optimization of extracting anthocyanins chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit and microencapsulation with maltodextrin and Capsul®. *Food and Bioproducts Processing*. (Artículo enviado el 13 de Noviembre de 2015, Manuscrito asignado No. FBP-D-15-00673).

Antonio-Gómez, M. V., Salinas-Moreno, Y., Contreras-Oliva, A., Herrera-Corredor, J. H. & Hernández-Rosas, F. Stability of microencapsulated anthocyanins chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) in an isotonic drink. (Artículo por enviar)

1.2 Participación en congresos

Antonio-Gómez, M.V., Salinas-Moreno, Y., Hernández-Rosas, F., Martínez-Bustos, F. Chapingo, Edo. De México, 22-24 Abril, 2015. Microencapsulado de antocianinas de *Ardisia compressa* K. empleando maltodextrina y Capsul® como material de pared. III Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas (Cartel).

Antonio-Gómez, M.V., Salinas-Moreno, Y., Hernández-Rosas, F. Chapingo, Edo. De México, 22-24 Abril, 2015. Optimización del proceso de extracción de antocianinas a partir de frutos de *Ardisia compressa* K. mediante superficie de respuesta. III Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas (Ponencia oral).

1.3 Hipótesis

El uso de antocianinas encapsuladas del chagalapoli en una bebida isotónica proporcionará color e incrementará su estabilidad en términos de retención y vida media de las antocianinas.

1.4 Objetivos

El Objetivo general de este trabajo fue encapsular las antocianinas presentes en el chagalapoli (*Ardisia compressa*) y evaluar la estabilidad del pigmento en una bebida isotónica.

Los objetivos específicos fueron:

1. Optimizar el proceso de extracción de antocianinas del fruto de chagalapoli e identificar las antocianinas mediante HPLC.
3. Encapsular las antocianinas con materiales de pared comerciales por la técnica secado por aspersión, evaluar su morfología, determinar la retención de antocianinas, la eficiencia de encapsulación y las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas.
4. Evaluar la estabilidad de las antocianinas microencapsuladas durante el almacenamiento a través de su tiempo de vida media, retención de antocianinas, color y perfil de antocianinas por HPLC
5. Elaborar una bebida isotónica adicionando color con las antocianinas microencapsuladas y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento a través de su tiempo de vida media, retención de antocianinas, color y perfil de antocianinas por HPLC.

1.5 Referencias

- Bakowska-Barczak, A.M., Kolodziejczyk, P.P., 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products* 34, 1301-1309.
- Boyer, R., McKinney, J., 2011. Food Storage Guidelines for Consumers, vol. 348–960. Virginia Cooperative Extension, pp. 1–12.
- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C. R. & Boirdignon-Luiz, M. T. 2011. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 186-193.
- Cam, M., Icyer, N. C. & Erdogan, F. 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *Lwt-Food Science and Technology*, 55, 117-123.
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F. & Hubinger, M. D. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115, 443-451.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T. & Meireles, M. A. A. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44, 499-509.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I. & Marin-Arroyo, M. R. 2013. Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 941-951.

- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., Cenkier, J. & Swirydow, E. 2015. Selected properties of microencapsulated oil powders with commercial preparations of maize OSA starch and trehalose. *Journal of Food Engineering*, 152, 72-84.
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z. & Chen, D. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *Lwt-Food Science and Technology*, 41, 155-160.
- Galaffu, N., Bortlik, K. & Michel, M. 2015. An industry perspective on natural food colour stability. In: SCOTTER, M. (ed.) *Colour Additives for Foods and Beverages*.
- Ghafoor, K., Hui, T. & Choi, Y. H. 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 735-746.
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225.
- Hategekirnana, J., Masamba, K. G., Ma, J. & Zhong, F. 2015. Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. *Carbohydrate Polymers*, 124, 172-179.
- Joaquin-Cruz, E., Duenas, M., Garcia-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C. & Garcia-Salinas, C. 2015. Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151-157.
- Lapornik, B., Prosek, M. & Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Lascurain, M., Avendaño, S., S., D. A. & Niembro, A. 2010. *Guía de frutos silvestres coemstibles en Veracruz*, Conafor-Conacyt, Mexico.
- Loksuwan, J. 2007. Characteristics of microencapsulated beta-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935.
- Murua-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I. & Martinez-Bustos, F. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91, 380-386.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F. & Durrieu, V. 2013. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.
- Pedro, A. C., Granato, D. & Rosso, N. D. 2016. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chemistry*, 191, 12-20.
- Rocha, G. A., Favaro-Trindade, C. S. & Ferreira Grosso, C. R. 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 37-42.

- Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., De Brito, E. S., Sousa, A. D. & Narain, N. 2015. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel. *Industrial Crops and Products*, 69, 400-407.
- Rojo, L.E., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M.H., Lila, M.A., Raskin, I., 2012. In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chem.* 131, 387-396.
- Shih, P., Chan, Y., Liao, J., Wang, M., Yen, G., 2010. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 21, 598-605.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teofilo, R. F. & 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, 538-544.
- Silva, V. M., Vieira, G. S. & Hubinger, M. D. 2014. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International*, 61, 132-143.
- Spada, J. C., Zapata Norena, C. P., Ferreira Marczak, L. D. & Tessaro, I. C. 2012. Study on the stability of beta-carotene microencapsulated with pinhao (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*, 89, 1166-1173.

CAPITULO II. ESTADO DEL ARTE

2.1 Características del fruto de chagalapoli

Ardisia compressa K. es una planta de la familia Myrsinaceae, arbusto o árbol pequeño de hasta de 7 m o más de alto con hojas lanceoladas, oblongas o elípticas de 6 a 20 cm de largo y de 3 a 9 cm de ancho. Produce frutos pequeños globosos de 10 a 15mm de diámetro, color purpura y con sabor dulce amargo (**Figura 1**). La época de floración es en los meses de diciembre a febrero, y el fruto se cosecha en los meses de enero a junio.

Crece en las regiones tropicales y subtropicales (Ramírez-Mares *et al.*, 2010). En México se puede encontrar en los estados de Sinaloa, Oaxaca y Veracruz; en este último, es común en los municipios de Actopan, Alto Lucero, Atzalan, Coatepec, Chocamán, Emiliano Zapata, Huatusco, Jalcomulco, Jilotepec, Misantla, Puente Nacional, San Andrés Tuxtla, Soteapan, Totutla, Xalapa y Uxpanapa (Lascurain *et al.*, 2010). En la región de los Tuxtlas es conocido como chagalapoli.

En la población indígena mexicana se ha utilizado como planta medicinal al consumir el té de las hojas como tratamiento para el cáncer. Investigaciones demuestran que el extracto acuoso de las hojas contiene compuestos fitoquímicos como la ardisina, que posee actividad antioxidante y antitumoral (González de Mejía, *et al.*, 2002), inhibición de la topoisomerasa I y II (González de Mejía *et al.*, 2004), y efecto citotóxico (Ramírez-Mares *et al.*, 1999).



Figura 1. Flores, frutos y semillas de chagalapoli (*Ardisia compressa* K.). a) flores, b) racimo de frutos inmaduros, c) frutos maduros, d) corte transversal de un fruto maduro, y e) semillas (fuente: propia).

El fruto de esta planta se consume en fresco, atoles, licores, helados (Lascurain *et al.*, 2010), bebidas refrescantes y dulces (Joaquin-Cruz *et al.*, 2015). Está compuesto principalmente por minerales como el potasio, fósforo, calcio y magnesio. Contiene un 86.85 % de agua y 9.65% de carbohidratos (**Tabla 1**). Al igual que en las hojas, se le atribuyen propiedades antioxidantes debido a su alto contenido de polifenoles, 1051.3 mg de GAE/100 g de peso fresco, que en su mayoría son

antocianinas (796 mg equivalentes a Cy3G /100 g de fruto fresco). Entre otros polifenoles que contiene, se encuentran la catequina, epicatequina, epicatequina-3,0-galato, quercetina 3-0-rutinosido y quercetina-3-o-glucosido, ácido cafeico y cumárico, flavonoles (Kaempferol, quercetina y miricetina). La composición de cada uno de los polifenoles se encuentra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición del fruto de chagalapoli

Componentes	Cantidad (%)	Compuestos fenólicos	Concentración (mg/g de materia seca)
Minerales		Antocianinas	
P	0.3	Malvidina 3-O-galactosido	61.69 ± 1.20
K	3.28	Delfinidina 3-O-galactosido	48.38 ± 2.43
Ca	0.41	Petunidina 3-O-galactosido	33.05 ± 1.37
Mg	0.35	Cianidina 3-O-galactosido	11.40 ± 0.33
S	2.01	Peonidina 3-O-galactosido	7.18 ± 0.18
Fe	0.034	Cianidina 3-O-arabinosido	3.59 ± 0.36
Zn	0.0007	Petunidina 3-O-arabinosido	2.45 ± 0.12
Mn	0.0024	Delfinidina 3-O-arabinosido	2.43 ± 0.36
Agua	86.85 ± 0.49	Malvidina 3-O-arabinosido	2.43 ± 0.31
Ceniza	0.58 ± 0.005	Malvidina di-O-hexóxido	1.96 ± 0.19
Extracto etéreo	0.54 ± 0.07	Otros polifenoles	
Proteína	0.77 ± 0.01	Catequina	0.12 ± 0.02
Fibra cruda	1.62 ± 0.02	Epicatequina	0.49 ± 0.01
Carbohidratos	9.64 ± 0.24	Miricetina-O-hexóxido	0.25 ± 0.05
		Kaempferol di-dioxihexosil-hexóxido	0.26 ± 0.02
		Epicatequina-3,0-galato	0.42 ± 0.02
		Quercetina 3-O-rutinosido	1.53 ± 0.38
		Quercetina 3-O-glucosido	1.22 ± 0.31
		Quercetina O-hexóxido I	1.16 ± 0.26
		Quercetina O-hexóxido II	0.41 ± 0.09
		Quercetina O-pentóxido	0.40 ± 0.09
		Quercetina O-dioxi hexóxido	2.85 ± 0.55

Fuente: Joaquín-Cruz *et al.*, 2015

Dada la composición de fenólicos en este fruto, podría convertirse en una fuente importante de pigmentos naturales por su alta composición de antocianinas y como ingredientes de alimentos nutraceuticos por su alta actividad antioxidante.

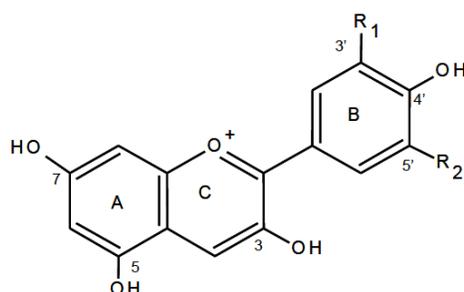
2.2 Antocianinas

Las antocianinas (del griego anthos, una flor, y kyanos, azul oscuro) son el grupo más grande y más importante de pigmentos solubles en agua en la naturaleza. Son colorantes naturales que

pertenecen a la familia de los flavonoides, responsables de los colores: azul, morado, rojo y naranja de la mayoría de las frutas, flores y otras partes de las plantas (Cavalcanti *et al.*, 2011).

2.2.1 Estructura química de las Antocianinas

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (**Figura 2**).



Aglicona	Sustitución		$\lambda_{\text{max}}/(\text{nm})$
	R ₁	R ₂	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Figura 2. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metóxilo de la molécula. Los incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Stintzing *et al.*, 2002). En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/ó 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser

alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico (Stintzing *et al.*, 2002). El tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura.

2.2.2 Antocianinas en frutillas

Las frutas contienen varios componentes que promueven la salud, incluida la fibra dietética y altas concentraciones de ácidos fenólicos, flavonoides, vitaminas y minerales. El consumo de frutillas se ha vuelto importante en la promoción de la salud de la población, principalmente debido a sus compuestos fenólicos, que se han asociado con la protección frente a diferentes patologías, por ejemplo, varios tipos de cáncer humano y por sus actividades anti-inflamatorias, gastroprotectores, antimicrobianos y otros biológicos (Basu *et al.*, 2010, Paredes-Lopez *et al.*, 2010). Uno de los grupos más importantes de compuestos fitoquímicos en las bayas está representado por las antocianinas. Las antocianinas existen en abundancia en el reino vegetal y le confieren colores azul, rojo, violeta y púrpura a las frutas y verduras, incluyendo las bayas (Clifford, 2000).

Seis antocianidinas son comunes en las plantas: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), Malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delfinidina (Dp). Las más extendidas en la naturaleza son los glucósidos de las antocianidinas no metiladas (Cy, Dp y PG), están presentes en un 80% en el pigmento de hojas, el 69% en las frutas y el 50% en las flores. La distribución de las seis antocianidinas más comunes en las frutas es cianidina (50%), pelargonidina (12%), peonidina (12%), delfinidina (12%), petunidina (7%), y malvidina (7%). Cianidina 3-glucósido es la más común en la mayoría de las frutas (Kong *et al.*, 2003) .

Diversas frutillas que contienen antocianinas se han estudiado (**Tabla 2**). Wu y Prior (2005) realizaron la identificación de las antocianinas presentes en frutillas comerciales, como son el Arándano morado, arándano rojo, uva morada, uva roja, fresa, mora, frambuesa roja, frambuesa negra y cereza. Glicósidos de cianidina fueron encontradas en todas las frutillas, la glucosa fue el monosacárido dominante y rutinosa el disacárido más común. Se encontró además que la mayoría contiene antocianinas aciladas, de ellas, el sustituto acilado predominante es el grupo acetilo.

Tabla 2. Distribución de antocianinas comunes en frutillas

Frutilla	Antocianidina						Fracción de azúcar							
	Dp	Cy	Pt	Pg	Pn	Mv	Glc	Gal	Ara	Xyl	Rha	Rut	Sam	Sop
Arándano morado	+	+	+		+	+	+	+	+					
Uva morada	+	+	+	+	+	+	+							
Uva roja	+	+	+		+	+	+							
Arándano rojo	+	+		+	+	+	+	+	+					
Fresa		+		+			+					+		
zarzamora		+		+	+		+			+		+		
Mora		+		+	+		+		+	+		+		
Frambuesa roja		+		+			+				+	+		+
Frambuesa negra		+		+	+		+				+	+	+	
Cereza		+		+	+		+					+		

Fuente: Wu y Prior, 2005.

Abreviaturas: (para antocianidinas) Dp:delfinidina, Cy:cianidina, Pt: pelargonidina, Pn: peonidina, Mv: malvidina; (para fracciones de azúcares) Glc:glucosa, Gal: galactosa, Ara: arabinosa, Xyl: xilosa, Rha: rhamnosa, Rut: rutinosa, Sam: sambubiosa, Sop: soforosa.

2.2.3 Importancia de las antocianinas como colorantes

Las antocianinas han sido consideradas como posibles colorantes alimentarios utilizados para reemplazar a los colorantes sintéticos. Las aplicaciones comerciales de las antocianinas como colorantes de alimentos incluyen bebidas (refrescos, bebidas isotónicas, bebidas alcohólicas), conservas de frutas (mermeladas, conservas de frutas), productos de confitería de azúcar (jaleas), productos lácteos (yogures, esencialmente), mezclas secas (mezclas para postres y bebidas en polvo ácido) y productos con menos frecuencia congelados (helado). Entre estas aplicaciones, los refrescos han sido el objetivo principal y es ideal para el uso de las antocianinas como colorante. El interés por las antocianinas y la investigación científica ha aumentado debido a que no solo confieren color a los productos que las contienen, sino también a sus beneficios nutraceuticos, principalmente como antioxidantes naturales y por la creciente preocupación por la toxicidad de los colorantes sintéticos usados en los alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Hallagan 1991, Breakey *et al.*, 2007).

Las antocianinas presentan diversos beneficios a la salud. Tsuda *et al.*, (2003) proporcionaron la evidencia de que al alimentar ratones con antocianinas extraídas de maíz azul y combinando con una dieta alta en grasas, reportaron que no hubo aumento de peso ni de tejido adiposo en los ratones.

Los síntomas típicos provocados por una dieta alta en grasas como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, y la hiperleptinemia no se presentaron cuando los ratones también ingirieron las antocianinas. Los experimentos sugieren que las antocianinas, como componentes funcionales de los alimentos, puedan ayudar en la prevención de la obesidad y de la diabetes, disfunción del hígado, hipertensión, problemas de visión, infecciones microbianas, diarrea etc. (Lila, 2004).

El ser humano puede convertir metabólicamente las antocianinas en ácidos fenólicos, siendo estos metabolitos los que contribuyen en beneficios a la salud. Investigaciones recientes sugieren que una tendencia de frutas ricas en glucósidos de cianidina, peonidina o pelargonidina exhiben mejores efectos antiinflamatorios que en frutos que contienen delphinidina, malvidina y petunidina (Fang, 2015).

2.2.4 Factores químicos que afectan a la estabilidad de las antocianinas

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos, 2004). Factores como: su misma estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

2.2.4.1 Efecto del pH

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. Las antocianinas se pueden encontrar en diferentes formas químicas que dependen del pH de la solución. A pH 1, el catión flavilio (color rojo) es la especie predominante y contribuye a colores púrpura y rojo (**Figura 3A**). A valores de pH entre 2 y 4, la especie quinoidal (color azul) son predominantes (**Figura 3B-D**). A valores de pH entre 5 y 6 solamente dos especies incoloras se pueden observar, que son una pseudobase carbinol (**Figura 3E**) y una chalcona (**Figura 3F**), respectivamente. A valores de pH superiores a 7, las antocianinas se degradan en función de sus grupos sustituyentes (**Figura 3**, reacción de degradación).

A valores de pH entre 4 y 6, cuatro formas estructurales del coexisten antocianinas: cationes flavilio, bases quinoidal anhidro, bases carbinol incolora y la chalcona amarillo pálido. El equilibrio entre las bases quinoidal y carbinol se produce a través del catión flavilio tal como se muestra en

la **Figura 3** (estructuras D, A y E). En condiciones más ácidas, la especie predominante es el ion flaviliojo (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

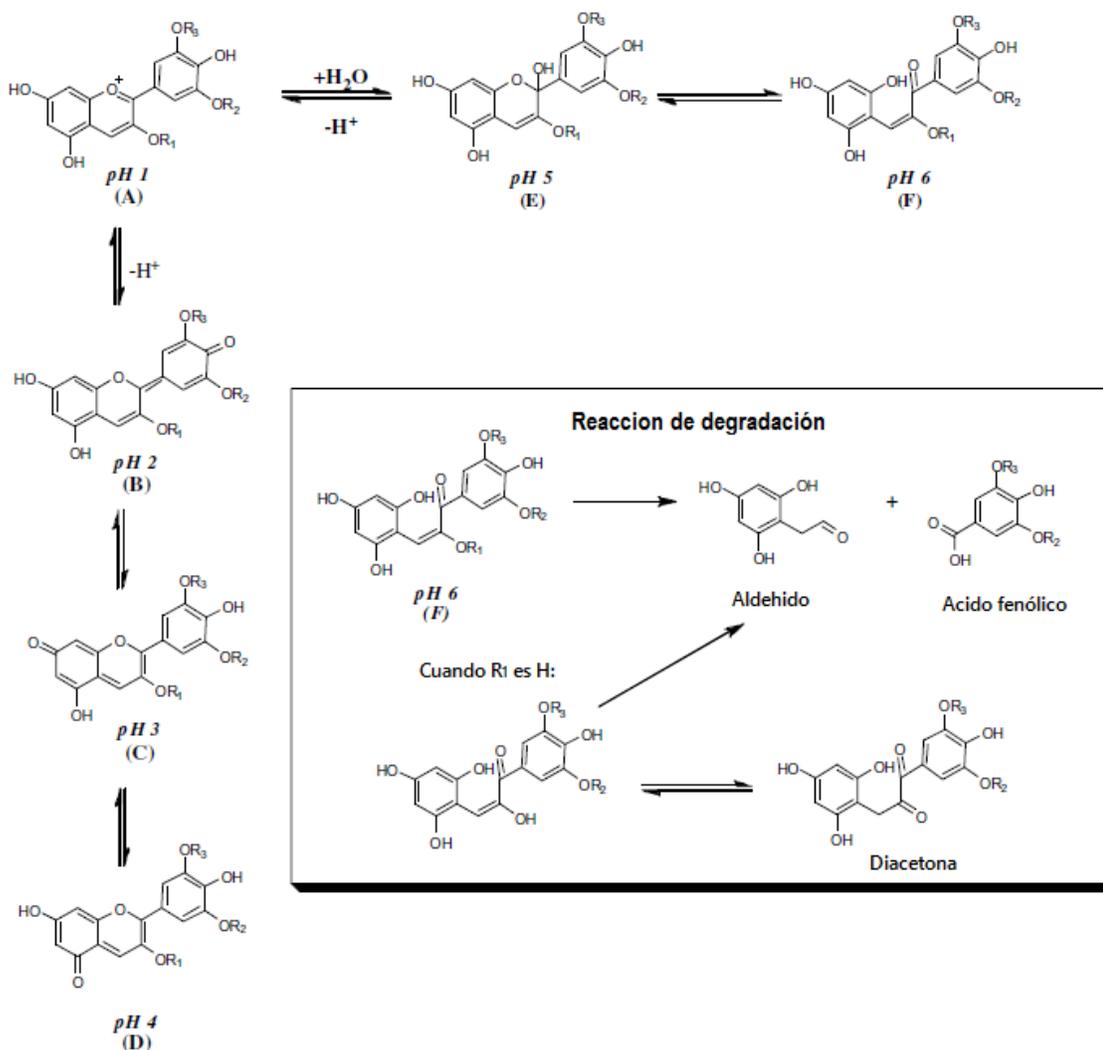


Figura 3. Formas químicas de antocianinas dependiendo de la reacción de pH y la degradación de antocianinas. Donde R₁ = H o sacárido, R₂ y R₃ = H o metilo (Castañeda-Ovando *et al.* 2009).

2.2.4.2 Efecto de la temperatura

La velocidad de degradación de las antocianinas aumenta a medida que la temperatura se incrementa (Yang *et al.*, 2008; Yang y Zhai, 2010). El mecanismo de degradación de las antocianinas por incremento de la temperatura en un medio acuoso a pH ácido (**Figura 4**), se lleva a cabo en varias etapas, en primer lugar ocurren reacciones de desglicosilación sucesivas

Garzón y Wrolstad (2002) confirmaron la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado por Jurd (1972) y Poesi-Langston (1981) como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos. La presencia de ácido ascórbico muestra un impacto negativo en la estabilidad de las antocianinas, provocando la degradación de las mismas. La cual consiste en la condensación de ácido ascórbico y el carbono cuatro de la molécula de antocianina, causando la pérdida de ambos (de Rosso y Mercadante, 2007).

2.2.4.4 Otros factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

La concentración del pigmento y la actividad de agua de la matriz afectan la estabilidad del color. Garzón y Wrolstad (2002) compararon la estabilidad de la antocianina de fresa (pelargonidina-3-glucósido) con la de la antocianina de la cáscara de rábano (pelargonidina-3-soforósido 5-glucósido acilada con ácidos aromáticos y alifáticos) y encontraron que dicha estabilidad era independiente de la estructura, a una misma concentración de pigmento. Hoshino *et al.*, (1992) demostraron que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de auto-asociación entre dos cationes flavilium, dos formas hemicetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilium y protegiendo la molécula de antocianina. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzon y Wrolstad, 2001). Por lo anterior, muchos estudios se han realizado con el objetivo de aumentar la estabilidad de estas sustancias. Entre ellas la encapsulación es una de las principales técnicas para aumentar su estabilidad.

2.3 Extracción de antocianinas

El método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Las condiciones de extracción, tales como relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo de disolvente y concentración de disolvente influyen en la estabilidad de las antocianinas, así como también en el rendimiento de la extracción de las antocianinas (Bridgers *et al.*, 2010). Así, se debe maximizar la recuperación de pigmentos, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto.

La extracción con disolvente ha sido el método más común para la extracción de diversos compuestos que se encuentran en las frutas, incluyendo los flavonoides. Los compuestos fenólicos se han extraído por trituración, secado o liofilización de las frutas, o únicamente por remojo frutas frescas con la extracción de disolvente posterior (Merken y Beecher, 2000). Las antocianinas son moléculas polares, por tanto, los disolventes más comunes utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona (Kähkönen *et al.*, 2001). La extracción con metanol es la más eficiente (Kapasakalidis *et al.*, 2006), se ha encontrado que en extracciones de antocianinas a partir de pulpa de uva, la extracción con metanol es 20% más eficaz que con etanol, y 73% más eficaz que sólo agua (Metivier *et al.*, 1980); sin embargo, en la industria alimentaria se prefiere el etanol debido a la toxicidad del metanol.

El uso de acetona no resulta apropiado debido a que las antocianinas sufren un cambio estructural, Lu y Foo (2001) confirmaron la formación de piranoantocianos cuando extrajeron antocianinas del sorgo. Por otro lado Lee *et al.* (2004) extrajeron antocianinas usando metanol acidificado con 0.1% de HCl y con acetona acuosa al 70%, los resultados fueron más eficientes con el metanol acidificado.

Los ácidos son esenciales para estabilizar las antocianinas en forma de catión flavilio (rojo) durante la extracción, pero el exceso puede dar lugar a la hidrólisis parcial del enlace glicosídico. Se ha utilizado metanol acidificado con ácidos débiles como el acético, fórmico y TFA para la extracción de antocianinas aciladas y evitar su hidrólisis (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Cuando se usa etanol, la extracción es más eficiente con HCl que con ácidos orgánicos (Oancea *et al.*, 2012, Todaro *et al.*, 2009)

La relación solido-solvente es otro factor importante en la extracción, un aumento en la proporción de solvente incrementa el gradiente de difusión, lo que significa un incremento de la difusión de los compuestos sólidos en el solvente, logrando una mejor extracción (Pedro *et al.*, 2016).

El aumento de la temperatura favorece la extracción, aumentando el coeficiente de difusión y la solubilidad de las antocianinas; sin embargo, a temperaturas mayores a 40°C disminuye el rendimiento de antocianinas (Cacace y Mazza, 2003).

Recientemente se han utilizado tecnologías como el ultrasonido (Celli *et al.*, 2015), microondas (Garofulic *et al.*, 2013) y el calentamiento óhmico (Loypimai *et al.*, 2015) para eficientar la extracción de las antocianinas.

2.4 Microencapsulación

Como se mencionó anteriormente, el problema principal asociado con el almacenamiento de antocianinas es su inestabilidad. Por lo tanto, la estabilización de las antocianinas es el objetivo de muchos trabajos. Entre los métodos de estabilización de antocianinas, la encapsulación es una técnica interesante (Cavalcanti *et al.*, (2011). En general, tres pasos están involucrados en la encapsulación de agentes bioactivos: (I) la formación de la pared alrededor del material a encapsular; (II) asegurar que no se produzcan fugas no deseadas; (III) garantizar que se mantienen fuera los materiales no deseados (Gibbs *et al.*, 1999; Mozafari *et al.*, 2008). El principal objetivo de la encapsulación es proteger el material del núcleo de las condiciones ambientales adversas, tales como efectos indeseables de la luz, la humedad y el oxígeno, contribuyendo así a un aumento en la vida útil del producto, y promover una liberación controlada del encapsulado (Shahidi y Han, 1993).

La utilización de antocianinas encapsuladas en lugar de compuestos libres puede superar los inconvenientes de su inestabilidad, así como mejorar su biodisponibilidad. Diferentes técnicas han sido utilizadas para la encapsulación de antocianinas como secado por aspersión, secado por enfriamiento, coacervación, gelación, evaporación de solventes, expansión supercrítica, polimerización interfacial, lecho fluidizado, polimerización de emulsión y extrusión (Nesterenko *et al.*, 2013). El secado por aspersión ha sido el más utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica, es un proceso que consiste en la conversión de la alimentación en un estado fluido en forma de partículas mediante la aspersión de la alimentación en un medio en estado gaseoso (Cal y Sollohub, 2010). El material encapsulado se denomina fase interna, corazón ó relleno, y el material que lo recubre se le llama material de pared, concha, membrana ó recubrimiento (Gibbs *et al.*, 2012). Las micropartículas formadas son pequeñas vesículas cuya medida puede variar, la medida de las partículas formadas por encapsulación se clasifican como: macro (>5000 μm), micro (1.0-5000 μm) y nano (<1.0 μm) (Jafari *et al.*, 2008).

La técnica de secado por aspersión para producir sabores microencapsulados fue descubierto por Boake Roberts (1937), cuando añadió acetona accidentalmente al puré de tomate mientras lo secaba por aspersión, esto ayudó a mantener el color y el sabor del tomate. Mediante esta técnica se han encapsulado vitaminas, minerales, colorantes, grasas, compuestos de aroma, oleorresinas y enzimas.

2.4.1 Secado por aspersión

Este método es el más utilizado en la industria alimenticia por ser el más económico para conservar los nutrientes (García *et al.*, 2004; Murúa *et al.*, 2009; Semyonov *et al.*, 2010), disponibilidad fácil de equipamientos, costos de procesamiento bajo, buena estabilidad del producto final y flexible (Favaro *et al.*, 2010). Se utiliza para la preparación de aditivos y sabores alimentarios secos y estables (Desai y Park, 2005).

En la **Figura 5**, se muestra el diagrama de un secador por aspersión. Para secar el material, es necesario homogenizar el agente activo con los materiales de la pared y esta mezcla es alimentada al secador. El proceso de secado consta de tres etapas: atomización, conversión de rocío a partícula y recolección de partículas. En la primera etapa, la mezcla (suspensión) es atomizada a través de una boquilla, posteriormente se lleva a cabo la conversión de rocío a partícula cuando el agua es evaporada por el aire caliente que entra en contacto con el material atomizado; finalmente los polvos se separan del aire caliente y se colectan en un frasco recolector para prevenir sobrecalentamiento. La forma típica de partículas secadas por aspersión es esférica, con un intervalo de tamaño medio de 10-100 μm (Fang y Bhandari, 2010).

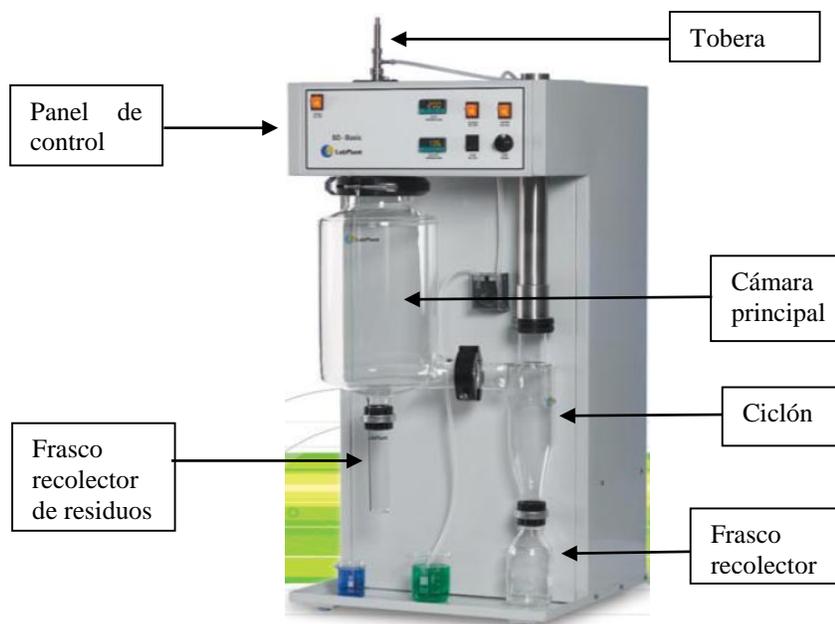


Figura 5. Diagrama del Secador por Aspersión Lab-Plan SD-03

Dentro de los parámetros más importantes a controlar durante el secado por aspersión se encuentran: las temperaturas de entrada y salida del aire de secado, el flujo de alimentación del producto a secar, el tiempo de residencia y el acondicionamiento de la materia prima (García *et al.*, 2004). Investigaciones demuestran que temperaturas altas de entrada de aire provocan pérdida de antocianinas en el producto. Jiménez-Aguilar *et al.* (2011) encontraron que, las pérdidas más bajas en el contenido de fenoles totales, antocianinas totales, y el color de las microcápsulas fue encontrado en 140 °C de temperatura de entrada del aire en lugar de 160 °C. Ersus y Yurdagel (2007) confirmaron este hallazgo de que las temperaturas de entrada/salida más altas causaron una mayor pérdida de antocianina durante el secado por aspersión, la temperatura óptima de secado se encontró de 160 °C en lugar de 180 °C o 200 °C. Por otra parte, Ibrahim Silva *et al.* (2013) aplicaron tres temperaturas de secado de aire diferentes de 140, 160, y 180 °C; siendo esta última la temperatura óptima.

En comparación con otros métodos, el secado por aspersión proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta. La mayor eficiencia de encapsulación que se alcanza con el secado por aspersión, se encuentra entre 96 y 100%, valores superiores en comparación con otros métodos (López y Gómez, 2008).

2.4.2 Materiales de pared empleados en la encapsulación de antocianinas

El paso más importante en la encapsulación de cualquier compuesto bioactivo mediante secado por aspersión, es la selección del material de pared adecuado que debe formar una película delgada continua y debe proteger el núcleo del deterioro. El material debe ser de bajo costo, de calidad alimentaria y legalmente permitido, debe ser insípido y debe ser estable durante almacenamiento. Es deseable que el material de pared tenga una alta solubilidad, emulsificación, de baja viscosidad a altas concentración de sólidos, baja higroscopicidad, de fácil liberación y de altas eficiencias de microencapsulación (Lee *et al.*, 2003). Sin embargo, es imposible que un solo material presente todas estas propiedades; por lo tanto, a menudo se utiliza una mezcla de dos o más componentes (Silva *et al.*, 2013).

Gran número de biopolímeros aprobados comercialmente están disponibles para producir antocianinas microencapsuladas por secado por aspersión, tales como: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas); gomas (arábica, mezquite, acacia, alginato de sodio) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos). El tipo de material tendrá

influencia en la estabilidad de la emulsión, el tamaño de la partícula, en las propiedades de flujo, las propiedades mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (Re, 1998, Risch, 1995). En la **Tabla 3** se muestra una relación de los materiales de pared usados en la encapsulación de antocianinas.

Según Shahidi y Han (1993), la maltodextrina se utiliza ampliamente como una pared en el secado por aspersión por satisfacer la demanda y su bajo costo. Las maltodextrinas resultan esenciales para preservar la integridad de las antocianinas durante su encapsulación. Hoy en día, las maltodextrinas se mezclan comúnmente con goma arábiga (Mahdavi *et al.*, 2014) o con almidones modificados (Silva *et al.*, 2014).

Otro material común para la microencapsulación es el almidón modificado por la adición de un componente lipófilico, octenilsuccinato, el cual aumenta la estabilidad de la emulsión. Almidón derivatizado por n-octenilsuccinato es utilizado por la industria alimentaria y farmacéutica con la aprobación de la FDA.

Las ciclodextrinas son moléculas cíclicas derivadas enzimáticamente a partir de almidón y tienen la capacidad para encapsular material activo dentro de su estructura de anillo. β -ciclodextrinas tienen tanto un carácter hidrófilo e hidrófobo que conduce a interacciones no covalente con materiales del núcleo adecuados para formar complejos estables. Pigmentos naturales como los flavonoides se pueden encapsular dentro de ciclodextrinas para formar complejos que protegen a los ingredientes de la oxidación, reacciones inducidos por la luz, y descomposiciones térmicas.

Goma arábiga es uno de los materiales de pared más utilizados para encapsular sabores y colorantes y es una buena elección como un material de la pared debido a la formación de emulsión estable y buena retención volátiles. Puede ser utilizada sola o combinada con otros encapsulantes en la producción de polvos a partir de extractos de pigmentos. Sin embargo, varios problemas están asociados con el uso de esta goma para la microencapsulación, incluyendo su alto costo y la oferta limitada (Ozkan y Bilek, 2014).

Tabla 3. Condiciones de operación y materiales de pared utilizados en la microencapsulación de antocianinas por secado por aspersión.

Fuente de antocianinas	Material de pared	Condiciones de operación		Eficiencia de encapsulación	Referencia
		Aire de entrada T (°C)	Aire de salida T (°C)		
Zanahoria negra (<i>Daucus carota</i> L.)	Diferentes maltodextrinas [Stardri 10 (10DE), Glucodry 210 (20-23 DE) y MDX 29 (20-31 DE)]	160	107	NR	(Ersus y Yurdagel, 2007)
		180	118		
		200	131		
Kokum (<i>Garcinia indica</i>)	Maltodextrina de varios DE (DE 06, 19, 21 y 33), goma acacia y fosfato tricalcico	150	80	NR	(Nayak y Rastogi, 2010)
<i>Berberis kaschgarica</i> <i>Opuntia stricta</i>	Maltodextrina, B-ciclodextrina, goma acacia	160	80	90-95	(Huang y Yang, 2011.) (Obon <i>et al.</i> , 2009)
	Jarabe de glucosa (DE 29)	160	50 a 68	NR	
Arándano (<i>Vaccinium sp.</i>)	Mezcla de aislados de proteína de soya (SPI)-maltodextrina y B-ciclodextrina-maltodextrina-goma arábica	120	80	92.48	(Ying-Chang <i>et al.</i> , 2010)
Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>) y tamarillo (<i>Solanum betaceum</i>)	Maltodextrina 20 DE	230	150	NR	(Olaya <i>et al.</i> , 2009)
Granada <i>Punica granatum</i>	Maltodextrina (MDX) y aislados de proteína de soya (APS)	140 a 160	100 a 140	APS= 35.8-100% MDX=89.4-100%	(Robert <i>et al.</i> , 2010)
Jugo de acai (<i>Euterpe oleraceae</i> Mart.)	Maltodextrina 10 DE, Maltodextrina 20 DE y goma arábica	140	82	NR	(Tonon <i>et al.</i> , 2008)
		170	97		
		200	112		
Pulpa de acai (<i>Euterpe oleraceae</i> Mart.)	Maltodextrina 10 DE, Maltodextrina 20 DE Goma arábica Almidón de tapioca	140	78	NR	(Tonon <i>et al.</i> , 2009)
Mora (<i>Rubus spp.</i>)	Maltodextrina 20 DE Goma arábica Mezcla de MDX-goma arábica (50:50)	145	75-80	NR	(Ferrari <i>et al.</i> , 2013)
Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Maltodextrina 11-15 DE Goma arábica Mezcla de MDX-goma arábica (60:40) Almidón soluble	150	100	99.69	(Idham <i>et al.</i> , 2012)
				98.40	
				99.87	
				96.70	

Continúa en siguiente hoja...

Fuente de antocianinas	Material de pared	Condiciones de operación		Eficiencia de encapsulación	Referencia
		Aire de entrada T (°C)	Aire de salida T (°C)		
Piel de jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>)	Maltodextrina 10 DE al 30%	140	NR	NR	(Silva <i>et al.</i> , 2013)
	Mezcla goma arábica-	160			
	maltodextrina 10 DE (25:5)	180			
	Mezcla Capsul TM - maltodextrina 10 DE (25:5)				
Hollejo de uva (<i>Vitis labrusca</i>)	Maltodextrina 10 DE	130	91 a 128	NR	(Souza <i>et al.</i> , 2015)
		150			
		170			
Arrayan (<i>Myrica rubra</i> Sieb. et Zucc)	Maltodextrina 10 DE	150	80	NR	(Fang y Bhandari, 2011)
Mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth.)	Maltodextrina 20 DE, goma arábica, almidón de maíz, almidón de yuca, Capsul® TA, Hi-Cap TM 100. Mezclas (1:1, p/p) de: maltodextrina DE 20/goma arábica, maltodextrina DE 20/almidón de maíz y maltodextrina DE 20/almidón de yuca	120	70	NR	(Villacrez <i>et al.</i> , 2014)
Berenjena (<i>Solanum melongena</i> L.)	Maltodextrina 10 DE al 15, 20 y 30%	170	NR	NR	(Arrazola <i>et al.</i> , 2014a)
		180			
Maíz morado <i>Zea mays</i> L.	Almidón de maíz normal Almidón de maíz ceroso Almidón acetilado de maíz normal Almidón acetilado de maíz ceroso	170	80	79.16	(García-Tejeda <i>et al.</i> , 2015)
				77.28	
				97.16	
				97.22	

NR: No reportado; MDX: maltodextrina

2.4.2.1 Maltodextrinas

Las maltodextrinas son polisacáridos nutritivos no dulces que consisten en una cadena de moléculas D-glucosa unidas por enlaces α -(1-4). La estructura química de la maltodextrina se muestra en la **Figura 6**. Se obtienen por hidrólisis ácida parcial del almidón (maíz, papa u otros) con un equivalente de dextrosa (DE) menor de 20, para la encapsulación de antocianinas es común el uso de entre 10 y 20 DE. En general el uso de maltodextrinas reduce significativamente la viscosidad de una suspensión, dado que presenta alta solubilidad en agua, lo que favorece su atomización en el secado por aspersión (Re, 1998, Pierucci *et al.*, 2007).

Las maltodextrinas han sido utilizadas en la microencapsulación de componentes alimenticios como grasas y aceites, vitaminas, minerales y colorantes. En la microencapsulación de antocianinas presentan eficiencias de encapsulación mayores al 95% y son mejores que los almidones debido a que son más solubles en agua y tienen grupos hidroxilo que pueden interactuar con los -OH de las antocianinas, son muy estables a temperaturas de 70°C, sin embargo, son muy higroscópicas y tienen que ser almacenadas a bajas humedades relativas ya que la humedad provoca la degradación de las antocianinas.

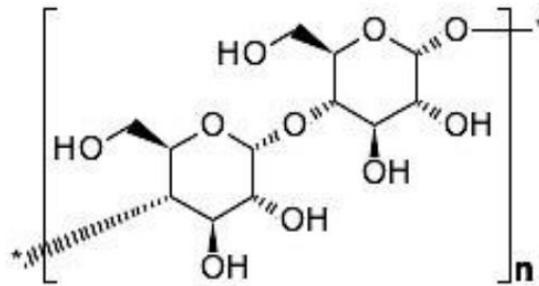


Figura 6. Estructura química de maltodextrinas

2.4.2.2 Almidones modificados

En la microencapsulación de flavonoides se han utilizado almidones nativos como: el almidón de maíz, papa, y yuca. Sin embargo, la retención de pigmentos en los almidones nativos aumenta cuando éstos son modificados por hidrólisis ácida, modificación química como los acetilados, fosfatados y succinatados entre otros. Por ejemplo a las 16 semanas de almacenamiento a una humedad del 32% el almidón de maíz presentó una retención de pigmentos del 79.7 % y en almidón ceroso de maíz fosfatado de 84.5 % (Cai y Corke, 2000). El almidón succinatado tiene buenas propiedades emulsificantes debido a su carácter anfifílico, por ejemplo: en la encapsulación de clorofila éste material es mejor que la goma arábiga y las maltodextrinas ya que prolonga su vida media a 462 días (Porrarud y Pranee, 2010).

Se denomina almidón modificado al que ha sufrido una alteración en sus características físicas o químicas con la finalidad de mejorar sus propiedades funcionales. El término “derivado de almidón” incluye a aquéllas modificaciones que cambian la estructura química de algunas de las unidades α -D-glucopiranosil (unidad anhidra de glucosa, UAG) en las moléculas del almidón nativo (Rutenberg y Solarek, 1984).

La modificación física, consiste en los tratamientos de calor y humedad, lo cuales están asociados con la disminución de la hidrólisis enzimática de la α -amilasa pancreática, se ha observado que al realizar varios ciclos de autoclave/enfriamiento, hay un aumento de almidón resistente por encima del 40% (Pomeranz, 1992) y además son destruidas las estructuras granulares del almidón, formándose conglomerados porosos que con tratamientos repetitivos, pasan a ser estructuras más compactas. También se han combinado los tratamientos físicos con los enzimáticos, como lo llevó a cabo Berry (1986), quien obtuvo de un 32 a 46% de almidón resistente al desramificar almidón ceroso con pululanasa, seguido con un tratamiento térmico.

Las modificaciones químicas se dividen en métodos de derivación (entrecruzamiento, estabilización y la adición de grupos funcionales) y métodos de conversión (hidrólisis, oxidación, dextrinización y conversión); pueden ser monofuncionales, polifuncionales, de doble derivación, oxidativas o hidrolíticas (Singh *et al.*, 2007).

El tipo más común de modificación de almidón es el tratamiento con pequeñas cantidades de reactivos químicos, debido a su alta eficiencia ya que brinda la posibilidad de controlar variables que influyen en las propiedades del material. Este tipo de modificación cambia las propiedades funcionales del almidón, se lleva a cabo por reacciones que involucran los grupos hidroxilos (OH) del polímero (Rutenberg y Solarek, 1984).

Las propiedades físicas, químicas y funcionales del almidón modificado son influenciadas por los grupos introducidos, así como por el grado de sustitución (GS), el cual se define como una medida del número de grupos OH de cada Unidad Anhidra de Glucosa (UAG) que son sustituidos por grupos químicos. Las UAG's del almidón nativo tiene tres grupos OH disponibles para ser sustituidos en las posiciones C2, C3 y C6; por lo que el GS máximo posible es de tres (Rutenberg y Solarek, 1984)

En el grupo de biopolímeros, los almidones modificados con anhídrido octenilsuccínico (OSA) es uno de los materiales de pared más preferidos debido a su buenas capacidades emulsionantes y de formación, bajas viscosidades, capacidad de alta carga de aceite, propiedades de barrera al oxígeno y de bajo peso molecular (Frascareli *et al.*, 2012). Además, las ventajas únicas de los almidones modificados OSA es que funcionan como estabilizadores de emulsiones y luego sirven como materiales de la pared (Hategekirnana *et al.*, 2015).

2.4.2.2.1 Capsul

Es un almidón comercial modificado químicamente derivado de maíz ceroso (National Starch & Chemical), el cual es modificado mediante la incorporación de un componente lipofílico (succinato de octenilo) que promueve una excelente estabilidad y capacidad para emulsionar (Rocha *et al.*, 2012). Se ha utilizado para microencapsular diferentes bioactivos poco hidrosolubles, una relación de ellos se indica en la **Tabla 4**.

Los esteres de almidón succinatado son preparados comercialmente por la reacción básica de anhídridos de alquenil succínico con el almidón granular en suspensión acuosa. La sustitución puede ocurrir en las posiciones 2, 3 y 6 de los carbonos de la unidad de glucosa. El anhídrido más utilizado para esta modificación es el octenilsuccinato. En la **Figura 7** se muestra la reacción de esterificación para obtener un almidón n-OSA.

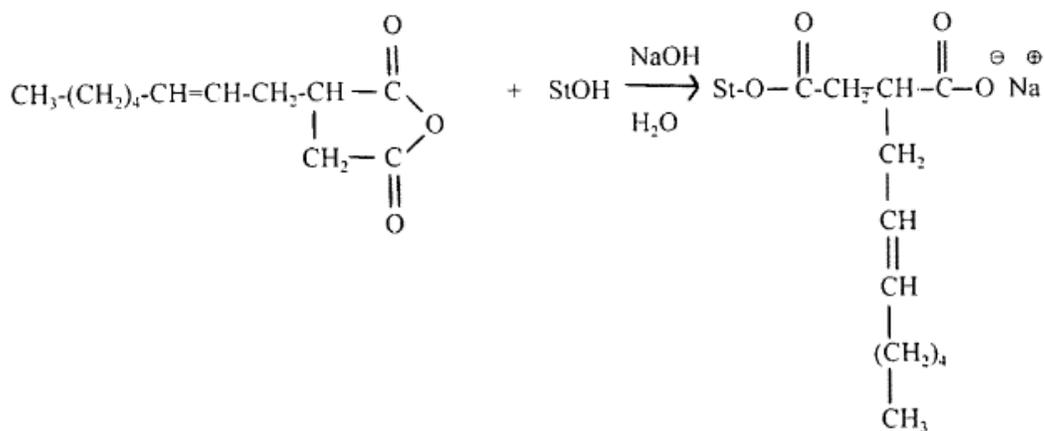


Figura 7. Esterificación del almidón con 1-octenil-anhídrido succínico

El anhídrido n-octenil succínico (OSA) ha sido autorizado por la FDA para ser utilizado en alimentos a nivel del 3%, esto corresponde a un grado de sustitución (DS) de 0.02. La modificación de los almidones con n-OSA fue patentada por Cadwell y Wurzburg en 1953 y reportado como un emulsionante eficaz en emulsiones agua/aceite.

Tabla 4. Activos encapsulados con Capsul

Agente de relleno	Concentración en suspensión (%) ^a	Referencia
Vitamina E	32%	(Hategekirnana <i>et al.</i> , 2015)
Aceites esenciales (trigo, linaza, tocoferol, colza)	9.9 y 19.8% (capsul) + 67% agua + 13.2% aceite.	(Domian <i>et al.</i> , 2015)
Licopeno	5, 10 y 15 %	(Rocha <i>et al.</i> , 2012)
Aceite de linaza	20%	(Carneiro <i>et al.</i> , 2013)
Aceite de café verde	15%	(Silva <i>et al.</i> , 2014)

^a % de activo respecto al % de solidos totales.

2.5 Estabilidad en antocianinas microencapsuladas

La estabilidad es un factor crucial a considerar cuando se utilizan pigmentos de antocianina como colorantes alimentarios. La cinética de degradación y la estabilidad del color de antocianinas encapsuladas por secado por aspersión a partir de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) fueron estudiados por Idham *et al.* (2012). En este estudio, tres biopolímeros diferentes (es decir, maltodextrina, goma arábica, combinación de maltodextrina y goma arábica, y almidón soluble) se utilizaron como materiales de pared. La estabilidad de los pigmentos encapsulados fue evaluada a tres diferentes temperaturas de almacenamiento (4, 25 y 37 °C) durante 105 días. Los biopolímeros incrementaron en gran medida la vida media de los pigmentos durante el almacenamiento, especialmente a 37 °C, en comparación con el extracto no encapsulado. Los estudios de degradación de muchos otros trabajos indican que el extracto encapsulado mediante secado por aspersión es más estable a la luz y la temperatura que el extracto libre, por lo que mejora la estabilidad de las antocianinas encapsuladas (Mahdavi *et al.*, 2014).

Burin *et al.* (2011) utilizaron maltodextrina, maltodextrina/c-ciclodextrina y maltodextrina/goma arábica como materiales de la pared para encapsular las antocianinas de uvas de Cabernet Sauvignon. Encontraron que la combinación de maltodextrina/goma arábica presentó el mayor tiempo de vida media y la más baja constante de degradación para todas las condiciones evaluadas. La estabilidad de las antocianinas añadidas a un sistema de bebida isotónica fue también estudiada bajo diferentes condiciones de temperatura y de luz. La degradación de las antocianinas se ajustó a un modelo de reacción de primer orden en todas las condiciones evaluadas.

Varios estudios han demostrado que la degradación de antocianinas es afectada principalmente por el tiempo y temperatura de almacenamiento (Patras *et al.*, 2010). La estabilidad es un factor crucial a considerar cuando se utilizan pigmentos de antocianina como colorantes alimentarios. Fracassetti *et al.* (2013) evaluaron los efectos del almacenamiento en el contenido de antocianinas de un polvo liofilizado (utilizado como colorante) de arándano silvestre (*Vaccinium angustifolium*) a 25 ° C, 42 ° C, 60 ° C y 80 ° C durante 49 días. El almacenamiento reduce el contenido de antocianinas, la reducción fue más lenta a 25 ° C (después de 2 semanas), mientras que fue más rápida a 60 ° C y 80 ° C después de 3 días. Sobre la base de este resultado, las vidas medias se determinaron para ser 139, 39, y 12 días a 25 ° C, 42 ° C, y 60 ° C, respectivamente.

2.5.1 Cinética de degradación de las antocianinas

Modelos cinéticos se utilizan a menudo para una evaluación objetiva, rápida y económica de la seguridad alimentaria. El modelado cinético puede también emplearse para predecir la influencia del procesamiento en parámetros de calidad críticos. El conocimiento de la degradación cinética, incluyendo orden de reacción, constante de velocidad y la energía de activación, son muy importantes para predecir la pérdida de la calidad de los alimentos durante el almacenamiento, así como en los tratamientos con procesos térmicos. Uno de los factores importantes a considerar en la elaboración de alimentos es la pérdida de nutrientes. Por lo tanto, se necesitan estudios cinéticos con el fin de minimizar el cambio no deseado y para optimizar la calidad de los alimentos.

La degradación de las antocianinas se ajusta a un modelo de reacción de primer orden en todas las condiciones evaluadas. Se ha confirmado que la degradación de antocianinas por calentamiento sigue una cinética de primer orden para el jugo y concentrado de cereza agria (Cemeroglu *et al.*, 1994) fresas (Garzon y Wrolstad, 2002) y moras (Wang y Xu, 2007).

2.6 Aplicación de antocianinas en alimentos

Colorantes microencapsulados se pueden usar comercialmente como pigmentos naturales de alimentos. Materiales alimenticios posibles podrían ser el yogur, helado, dulces, cerezas en almibar y otros productos de confitería. Además, gomas de mascar, snacks y productos para los niños son los principales productos alimenticios que requieren colorantes naturales. Productos de panadería tales como galletas son también un grupo de alimentos que requieren coloración considerablemente (Ozkan y Bilek, 2014). Las aplicaciones alimenticias de pigmentos de antocianinas han sido investigadas en varios estudios (*Tabla 5*).

Los primeros antecedentes de aplicación de antocianinas fueron en el yogur, se basan en la adición de jugo de acaí (Croisson *et al.*, 2005) y fruta liofilizada de *Berberis boliviana* (Wallace y Giusti., 2008) en un yogur comercial. Sin embargo, estos ejemplos exitosos difieren de los resultados de estudios sobre las antocianinas durante el proceso de formulación de yogur. Karaaslan *et al.* (2011) han evaluado la incorporación de extractos etanólicos de uva en la producción de yogur, señalando una degradación significativa de antocianinas durante el almacenamiento. Resultados similares fueron reportados por Sun-Waterhouse *et al.* (2013), quien indicó que la fermentación afecta el contenido de antocianinas de extracto de grosella negra durante el proceso de formulación de yogur. Además, Scibisz *et al.* (2012) determinó que ciertos cultivos probióticos afectan significativamente la estabilidad de las antocianinas del arándano cuando se añade al yogur. La microencapsulación se ha utilizado como una estrategia para reducir los problemas de la estabilidad de las antocianinas que se utilizan como colorantes naturales. Robert *et al.* (2010) compararon la cinética de degradación de antocianinas encapsuladas y no encapsuladas a partir de jugo de granada, obtuvieron similares constantes de degradación cuando se aplicaron al yogur, mostrando la pérdida de la protección después de la adición al yogur. Este hallazgo puede explicarse por la solubilidad del material de pared en matrices hidrófilas. Por lo tanto, la selección de un material de pared que permite la dispersión de micropartículas puede ser una alternativa en el diseño de un producto lácteo (Robert y Fredes, 2015).

Tabla 5. Aplicación de antocianinas en alimentos

Fuente de antocianinas	Estado de antocianinas	Alimento	Condiciones evaluadas	Vida media (horas)	Referencia
Uvas de Cabernet Sauvignon	Antocianinas microencapsuladas con maltodextrina, mezcla de maltodextrina (MDX)-ciclodextrina (CDX) y maltodextrina-goma arábica (GA)	Bebida isotónica	Almacenamiento a 4 y 25°C con presencia y ausencia de luz	MDX: a 25°C, 556.2 (A/L), 379.7 (P/L). MDX-CDX: a 25 °C, 591.8 (A/L), 384.1 (P/L). MDX-GA: 644.6 (A/L), 526.3 (P/L)	(Burin <i>et al.</i> , 2011)
Cascara de berenjena	Antocianinas encapsuladas con maltodextrina Extracto de antocianinas (no encapsuladas)	Bebida isotónica	Almacenamiento a 4 y 25°C en ausencia de luz	25°C: 319.9 4°C: 684.3	(Arrazola <i>et al.</i> , 2014)
Cascaras de jambolan	Extracto acuoso de antocianinas	Bebida	Almacenamiento en ausencia de luz a 7 y 28°C	7°C: 151 28°C: 25.6	(Sari <i>et al.</i> , 2012)

A/L: ausencia de luz; P/L: presencia de luz

Investigaciones previas respecto a la estabilidad de las antocianinas aplicadas en alimentos sugieren que se puede lograr una mayor estabilidad de las antocianinas mediante el uso de bajas temperaturas y calentamientos de corto tiempo durante el procesamiento y almacenamiento (Patras *et al.*, 2010).

2.7 Referencias

- Arrazola, G., Herazo, I. & Alvis, A. 2014. Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante: Información tecnológica, 25, 31-42.
- Basu, A., Rhone, M. & Lyons, T. J. 2010. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*, 68, 168-177.
- Berry, C. S. (1986). Resistant starch: formation y measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 4: 301-314.
- Breakey J, Reilly C, Connell H. 2002. The Role of Food Additives y Chemicals in Behavioral, Learning, Activity, y Sleep Problems in Children. In: Branen A L, Davidson PM, Salminen S, Thorngate III J H, editors. Food additives. New York: Marcel Dekker Inc.; p. 87-88.

- Bridgers, E.N.; Chinn, M.S.; Truong, V.D. (2010). Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial*, en: *Crops and Products*, 32 (3): 613–620.
- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C. R. & Boirdignon-Luiz, M. T. 2011. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 186-193.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68, 240–248.
- Cai, Y. Z. & Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65, 1248-1252.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. D., Paez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A. & Galan-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T. & Meireles, M. A. A. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, 44, 499-509.
- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T., Meireles, M.A.A., 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Res. Int.* 44, 499-509.
- Celli, G. B., Ghanem, A. & Brooks, M. S.-L. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 449-455.
- Cevallos-Casals, B.A., Cisneros-Zevallos, L., 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem.* 86, 69-77.
- Clifford, M. N. 2000. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1063-1072.
- Coisson, J.D.; Travaglia, F.; Piana, G.; Capasso, M.; Arlorio, M. 2005. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. *Food Res. Int.* 38, 893–897.
- De Rosso, V. V. & Mercadante, A. Z. 2007. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 347-352.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., Cenkier, J. & Swirydow, E. 2015. Selected properties of microencapsulated oil powders with commercial preparations of maize OSA starch and trehalose. *Journal of Food Engineering*, 152, 72-84.
- Durst R., Wrolstad R. E. 2001. Separation y Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Hybook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley y Sons; p. 33-45.

- Ersus, S. & Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812.
- Fang, J. 2015. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*, 31, 1301-1306.
- Fang, Z. & Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Fang, Z. & Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.
- Favaro, C., A. Santana, E. Monterrey, M. Trindade and F. Netto. 2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids* 24(4): 336-340.
- Ferrari, C. C., Marconi Germer, S. P., Alvim, I. D. & De Aguirre, J. M. 2013. Storage Stability of Spray-Dried Blackberry Powder Produced with Maltodextrin or Gum Arabic. *Drying Technology*, 31, 470-478.
- Fracassetti, D.; Del Bo, C.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Klimis-Zacas, D.; Ciappellano, S. 2013. Effect of time and storage temperature on anthocyanin decay and antioxidant activity in wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) powder. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2999–3005.
- Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V. & Hubinger, M. D. 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 413-424.
- García, G., M. González, M. Ochoa y H. Medrano. 2004. Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersión. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria* 4(4): 262-266.
- García, G., M. González, M. Ochoa y H. Medrano. 2004. Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersión. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria* 4(4): 262-266.
- Garcia-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y. & Martinez-Bustos, F. 2015. Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 717-726.
- Garofulic, I. E., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A. R. & Jukic, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117, 437-442.
- Garzon, G. A. & Wrolstad, R. E. 2001. The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. *Food Chemistry*, 75, 185-196.
- Garzon, G. A. & Wrolstad, R. E. 2002. Comparison of the stability of pelargonidin-based Anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *Journal of Food Science*, 67, 1288-1299.
- Hategekirnana, J., Masamba, K. G., Ma, J. & Zhong, F. 2015. Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. *Carbohydrate Polymers*, 124, 172-179.
- Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T. y Harada, N. (1982). Evidence for the self association of anthocyanins in neutral aqueous solution. *Tetrahedron Letters*. 433.

- Huang, J.; Yang, L. 2011. Microencapsulation of anthocyanins from fruits of *Berberis kaschgarica* Rupr. *Journal of Food Science*, 16, 5–14.
- Idham, Z., Muhamad, I. I. & Sarmidi, M. R. 2012. Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *hibiscus sabdariffa* l. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 522-542.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., Bhandari, B., He, Y., 2008. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Res. Int.* 41, 172-183.
- Jimenez-Aguilar, D. M., Ortega-Regules, A. E., Lozada-Ramírez, J. D., Perez-Perez, M. C. I., Vernon-Carter, E. J. & Welti-Chanes, J. 2011. Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 889-894.
- Joaquin-Cruz, E., Duenas, M., Garcia-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C. & Garcia-Salinas, C. 2015. Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151-157.
- Jurd, L. 1972. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type pigments. In: Chichester CO, Editor. *The Chemistry of Plant Pigments*. New York: Academic Press, p. 123-142.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076–4082.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., & Gordon, M. H. (2006). Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4016–4021.
- Karaaslan, M.; Ozden, M.; Vardin, H.; Turkoglu, H. 2011. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT—Food Sci. Technol.* 44, 1065–1072.
- Kong, J. M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F. & Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins, Review. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- Lascurain, M., Avendaño, S., S., D. A. & Niembro, A. 2010. Guía de frutos silvestres comestibles en Veracruz, Conafor-Conacyt, México.
- Lee, J., Finn, C. E., & Wrolstad, R. E. (2004). Comparison of anthocyanin pigment and other phenolic compounds of *Vaccinium membranaceum* and *Vaccinium ovatum* native to the Pacific Northwest of North America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7039–7044.
- Lee, J. Y., Park, H. J., Lee, C. Y. & Choi, W. Y. 2003. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 36, 323-329.
- López, H. y D. Gómez. 2008. Preparación de microesferas mediante secado por aspersión, [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152008000300010&Ing=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152008000300010&Ing=es;); consulta: febrero 2015.
- Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P. & Moontree, T. 2015. Ohmic heating-assisted extraction of anthocyanins from black rice bran to prepare a natural food colourant. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 102-110.

- Lu, Y., & Foo, L. Y. (2001). Unusual anthocyanin reactions with acetone leading to pyranoanthocyanin formation. *Tetrahedron Letters*, 42, 1371–1373.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M. & Assadpoor, E. 2014. Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*, 32, 509-518.
- Markaris, P., Livingston, G.E., Fellers, C.R., 1957. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation a,b, *J. Food Sci.* 22, 117-130.
- Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 577–599.
- Metivier, R. P., Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. (1980). Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45(4), 1099–1100.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11, 833-844.
- Murúa, B., C. Beristain and Martínez. F. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering* 91(3): 380–386.
- Nayak, C. A. & Rastogi, N. K. 2010. Effect of Selected Additives on Microencapsulation of Anthocyanin by Spray Drying. *Drying Technology*, 28, 1396-1404.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F. & Durrieu, V. 2013. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.
- Oancea, A., S., Stoia, M. and Coman, D., 2012. Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications. 20th International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012, 25 – 29 August 2012, Prague, Czech Republic. *Procedia Engineering*, 42:489–495.
- Obon, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M. & Fernandez-Lopez, J. A. 2009. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90, 471-479.
- Olaya, C. M., Castaño, M. P. & Garzón, G. A. 2009. Stability of anthocyanins from *Rubus glaucus* and *Solanum betaceum* Cav. dark-red strain as affected by temperature, storage and water activity. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 143-158.
- Ozkan, G. & Bilek, S. E. 2014. Microencapsulation of Natural Food Colourants. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3, 145-156.
- Paredes-Lopez, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Perez, M. & Hernandez-Perez, T. 2010. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life-A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 299-308.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'donnell, C. & Tiwari, B. K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 3-11.

- Pedro, A. C., Granato, D. & Rosso, N. D. 2016. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chemistry*, 191, 12-20.
- Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Farina, M., Pedrosa, C. & Rocha-Leao, M. H. M. 2007. Comparison of alpha-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *Journal of Microencapsulation*, 24, 201-213.
- Poei-Langston, M.S., Wrolstad, R.E., 1981. Color Degradation in an Ascorbic Acid-Anthocyanin-Flavanol Model System. *J. Food Sci.* 46, 1218-1236.
- Pomeranz, Y. 1992. Research and development regarding enzyme-resistant carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: 63-68.
- Porrarund and Pranee. 2010. Microencapsulation of Zn.cholophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. *International Food Research Journal*. 17: 1031-1042.
- Ramirez-Mares, M. V., Fatell, S., Villa-Trevino, S. & De Mejia, E. G. 1999. Protection of extract from leaves of *Ardisia compressa* against benomyl-induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 13, 889-896.
- Re, M. I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 1195-1236.
- Risch, S.J. 1995. Encapsulation: Overview of uses and techniques. En: Encapsulation and controlled released of food ingredient. Risch, S.J., Reineccius, G.A., Eds. ACS Sym Ser 590. Washington, D.C. American Chemical Society. Pp. 2-7.
- Robert, P. & Fredes, C. 2015. The Encapsulation of Anthocyanins from Berry-Type Fruits. Trends in Foods. *Molecules*, 20, 5875-5888.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J. & Saenz, C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1386-1394.
- Rocha, G. A., Favaro-Trindade, C. S. & Ferreira Grosso, C. R. 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 37-42.
- Rutenberg, R. W. & Solarek, D. 1984. Starch derivatives: Production and uses. In: R.L. Wistler, J. N. B., E. F. Paschall (ed.) *Starch Chemistry and Technology*. 2nd ed. Academic Press: New York, E.U.A.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C. & Carle, R. 2006. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71, C504-C512.
- Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D. & Supratman, U. 2012. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*, 132, 1908-1914.
- Ścibisz, I.; Ziarno, M.; Mitek, M.; Zaręba, D. 2012. Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanins in blueberry yoghurts. *LWT—Food Sci. Technol.* 49, 208–212.
- Semyonov, D., O. Ramon, Z. Kaplun, L. Brener, N. Gurevich and E. Shimoni. 2010. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International* 43(1): 193-202.

- Shahidi, F. & Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F. & 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, 538-544.
- Singh, J., Kaur, L. & Mccarthy, O. J. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications - A review. *Food Hydrocolloids*, 21, 1-22.
- Sondheimer, E., Kertesz, Z.I., 1953. Participation of ascorbic acid in the destruction of anthocyanin in strawberry juice and model systems. *J. Food Sci.* 18, 475-479.
- Souza, V. B. D., Thomazini, M., De Carvalho Balieiro, J. C. & Favaro-Trindade, C. S. 2015. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, 93, 39-50.
- Stintzing, F.C., Stintzing, A.S., Carle, R., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002. Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-Based Anthocyanin Pigments. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6172-6181.
- Sun-Waterhouse, D.; Zhou, J.; Wadhwa, S.S. 2013. Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control*. 32, 450-460.
- Todaro, A., Cimino, F., Rapisarda, P., Catalano, A. E., Barbagallo, R. N. & Spagna, G. 2009. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114, 434-439.
- Tonon, R. V., Brabet, C. & 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, 411-418.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P. & Hubinger, M. D. 2009. Physicochemical and morphological characterisation of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950-1958.
- Tsuda T, F Horio, K Uchida, H Aoki, T Osawa. 2003. Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Nutrient-Gene Interact.* 314:2125-2130.
- Villacrez, J. L., Carriazo, J. G. & Osorio, C. 2014. Microencapsulation of Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) Aqueous Extract by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1445-1456.
- Wallace, T.C.; Giusti, M.M. 2008. Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *J. Food Sci.* 73, C241-C248.
- Wu, X. L. & Prior, R. L. 2005. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589-2599.

Ying-chang, L.; Chun-mao, L.; Xian-jun, M.; Yong, M. 2010. Study on the Microencapsulation of blueberry anthocyanins. *Food and Fermentation Industrie*, 6, 24–29.

CAPÍTULO III. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE CHAGALAPOLI (*Ardisia Compressa* K.) Y MICROENCAPSULACIÓN CON MALTODEXTRINA Y CAPSUL®

María Vianey Antonio-Gómez^a, Yolanda Salinas-Moreno^b, Fernando Martínez-Bustos^c Francisco Hernández-Rosas^{a,*}

^a *Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Postgrado en Innovación Agroalimentaria Sustentable. Km 348 Carretera Córdoba-Veracruz. 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz.*

^b *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo experimental Centro Altos de Jalisco, Km 8 Carretera Tepatitlán-Lagos de Moreno. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. CP 47600.*

^c *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro, Libramiento Norponiente No. 2000, Fraccionamiento Real de Juriquilla, C.P. 76230 Santiago de Querétaro, Querétaro, México.*

Autor de correspondencia: Francisco Hernández Rosas

E-mail: fhrosas@colpos.mx

Teléfono: ++52 271 131 5840

Artículo Recibido: 13 de Noviembre del 2015

En: Food and Bioproducts Processing

RESUMEN

Chagalapoli es el fruto de *Ardisia compressa* K. con un elevado contenido de antocianinas. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones óptimas para la extracción de sus antocianinas mediante la metodología de superficie de respuesta y realizar su microencapsulado por secado por aspersión usando dos agentes encapsulantes comerciales. Los factores probados en la extracción fueron proporción de etanol, pH y tiempo de sonicado. Como agentes encapsulantes se usaron maltodextrina (MD) y Capsul (CP) en diferentes proporciones. De las variables estudiadas para optimizar el proceso de extracción de antocianinas a partir del fruto chagalapoli, únicamente la concentración de etanol y el pH fueron significativas para el modelo que mostró un elevado ajuste con los datos experimentales ($R^2=0.9760$). El proceso de extracción optimizado consistió en utilizar etanol al 63.5%, un pH de 2 y un tiempo de sonicado de 30 min, con una relación pulpa de fruto:solvente de 1:5 peso/volumen. Bajo las condiciones optimizadas se obtuvieron 1545.45 ± 16.34 mg equivalentes de Mv3gal/100 g de tejido fresco. Las antocianinas del fruto chagalapoli obtenidas bajo estas condiciones y microencapsuladas en una mezcla de Capsul:maltodextrina 50:50, presentaron una eficiencia de encapsulación de 99% y una retención de antocianinas de 95%. Las variables de higroscopicidad (11.48g/100g), contenido de humedad (2.47%) y actividad de agua (0.13) de las microcápsulas obtenidas son favorables para la conservación y almacenamiento de las microcápsulas.

Palabras clave: secado por aspersión, extracción, metodología de superficie respuesta.

Lista de Abreviaturas

ACK: *Ardisia compressa* K.; SEM: Microscopia electrónica de barrido; AR: Retención de antocianinas; EE: Eficiencia de encapsulación; TAC: Contenido total de antocianinas; SAC: Contenido de antocianinas superficiales; MC: Contenido de humedad; H: Higroscopicidad; a_w : Actividad de agua; Mv3gal: Malvidina-3-galactosido; Mv3G:Malvidina-3-glucosido.

3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, un número creciente de investigaciones ha relacionado el uso de colorantes sintéticos con problemas de salud, esto ha llevado a la industria a la sustitución de los colorantes artificiales por pigmentos naturales (Galaffu *et al.*, 2015). Las antocianinas son un grupo importante de pigmentos naturales hidrosolubles e inoocuos que se agrupan en la familia de los flavonoides (Giusti y Wrolstad, 2003), representan una alternativa para la sustitución de los colorantes sintéticos con las tonalidades rosa salmón, rojo, azul y púrpura. Sin embargo, en el proceso de caracterización y aprovechamiento de antocianinas, la extracción es una etapa muy importante, que influye no sólo en el rendimiento y rentabilidad de la extracción, sino que también afecta el tipo de fenoles que se extraen (Lapornik *et al.*, 2005) y su estabilidad (Pedro *et al.*, 2016). Los factores más estudiados en el proceso de extracción de antocianinas son: proporción sólido: solvente (Fan *et al.*, 2008, Pedro *et al.*, 2016), tipo de solvente, temperatura de extracción (Ghafoor *et al.*, 2011), tiempo de extracción (Lapornik *et al.*, 2005, Pedro *et al.*, 2016) y pH (Rodrigues *et al.*, 2015, Burin *et al.*, 2011). Recientemente se ha agregado la aplicación de tecnologías como el ultrasonido (Celli *et al.*, 2015), microondas (Garofulic *et al.*, 2013) y el calentamiento óhmico (Loypimai *et al.*, 2015). El efecto de las condiciones de extracción en el rendimiento y composición de antocianinas va a depender de la fuente vegetal (Lapornik *et al.*, 2005) de ahí que es recomendable particularizarlas de acuerdo a la matriz de que se trate. Por otro lado, las antocianinas son inestables a factores, tales como pH, temperatura elevada, luz, oxígeno, iones metálicos y enzimas, entre otros (Shenoy, 1993) lo que limita su uso en alimentos, que generalmente se procesan en condiciones donde varios de estos factores están presentes.

Una alternativa para mejorar la estabilidad de las antocianinas es encapsularlas en materiales diversos, tales como gomas, polisacáridos, lípidos, proteínas, fibras y mezclas de ellos (Davidov-Pardo *et al.*, 2013). Esta diversidad se debe a que algunos materiales resultan más adecuados para determinados bioactivos. En particular, los materiales de pared empleados en la microencapsulación por secado por aspersión deben ser emulsificables, permitir alta solubilidad y baja higroscopicidad (Loksuwan, 2007). En este sentido las maltodextrinas son de los materiales más comunes debido a su alta solubilidad y baja viscosidad (Tonon *et al.*, 2010), en tanto que el Capsul es un almidón modificado químicamente mediante la incorporación de un componente lipofílico (succinato de octenilo), que promueve una excelente estabilidad y capacidad para emulsionar (Rocha *et al.*, 2012). El Capsul ha sido utilizado para encapsular compuestos bioactivos

de baja polaridad tales como vitamina E (Hategekirnana *et al.*, 2015), licopeno (Rocha *et al.*, 2012) y aceites esenciales de trigo, linaza y tocoferol (Domian *et al.*, 2015). El agente de recubrimiento por sí solo no ofrece todas las propiedades requeridas para asegurar una buena microencapsulación, por lo tanto una mezcla de uno o más componentes se emplea con frecuencia para mejorar la encapsulación (Turchiuli *et al.*, 2005).

Diversos frutos tropicales han emergido como fuentes potenciales de antocianinas (De Brito *et al.*, 2007), dentro de estos, el fruto de *Ardisia compressa* K. denominado chagalapoli posee un elevado contenido de estos flavonoides (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015), por lo que es una fuente importante de pigmentos. Sin embargo, se requiere determinar las mejores condiciones para su extracción y la forma en que puedan ser más estables, por lo que el presente estudio tuvo como objetivos optimizar la extracción de las antocianinas del chagalapoli y realizar su microencapsulado a través de Capsul y maltodextrinas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Reactivos y material vegetal

Las sustancias químicas usadas incluyeron: etanol (Baker®), ácido clorhídrico (Baker®), ácido fórmico (Brand®) y metanol (Baker®), grado reactivo analítico. También se usaron agua y metanol grado HPLC para el análisis de las antocianinas. Los estándares comerciales de malvidina 3-*O*-galactosido y delfinidina 3-*o*-galactosido fueron adquiridos de Extrasynthese (Genay, Francia). Los materiales de pared usados fueron Capsul® (National Starch, USA) y maltodextrina 10 DE (IMMSA, S.A de C.V).

El material vegetal consistió de frutos maduros de chagalapoli (*A. compressa*) que fueron obtenidos en el mercado regional de San Andrés Tuxtla, Veracruz. El hueso se eliminó del fruto y la pulpa fue homogenizada con un equipo Ultra Turrax (básico T-10, IKA, USA) durante un minuto a una velocidad de 20 450 rpm.

3.2.2 Extracción de antocianinas

La metodología de superficie de respuesta se utilizó para optimizar las condiciones de extracción de las antocianinas del fruto de *Ardisia compressa* K. (ACK). Se realizaron pruebas previas para determinar la proporción muestra:solvente más adecuada, y poder correr los tratamientos con esta variable fija. El diseño experimental se llevó a cabo utilizando un diseño Box-Behnken con tres

factores: pH (x_1), concentración de etanol (x_2) y tiempo de sonicación (x_3), con tres niveles cada uno (**Tabla 6**), la variable respuesta fue el contenido de antocianinas totales (TAC). A partir de este diseño resultaron 15 tratamientos (T1 hasta T15), cuyas particularidades se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 6. Variables independientes de proceso, rango y niveles utilizados para el diseño de Box-Behnken.

	Factores	Niveles codificados		
Variable independiente	X	-1	0	+1
pH del disolvente	X_1	2.0	2.5	3.0
Concentración de etanol (%)	X_2	50	75	100
Tiempo de sonicación (min)	X_3	10	20	30

Se utilizó un tamaño de muestra de 2 g de pulpa homogeneizada y 10 mL de solvente, que fueron constantes para todos los tratamientos. La muestra se agitó por 30 minutos en un agitador horizontal a temperatura ambiente y con protección a la luz. El extracto fue recuperado al centrifugar (centrifuga Hettich®, Modelo Universal 32) la muestra a 2200 g por 10 min. y se cuantificó el contenido de antocianinas totales, que fue la variable respuesta, conforme a la metodología empleada por Salinas *et al.* (2005). El TAC se expresó en función de malvidina 3-O-galactosido (Extrasintese, Genay, FR), con la cual se elaboró una curva patrón. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Mv3gal/100 g de tejido fresco.

Se construyó un modelo polinomial de segundo orden para estimar la respuesta (**ecuación 1**), donde y es la respuesta estimada (variable dependiente), β_0 es la constante del modelo, β_i el coeficiente de efecto lineal, β_{ii} el coeficiente de efecto cuadrático, β_{ij} el coeficiente de la interacción de dos factores, x_i , x_j las variables independientes, k el número de variables consideradas, i y j los factores codificados del sistema (Swamy *et al.*, 2014).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

3.2.3 Análisis de antocianinas en el extracto de chagalapoli por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se utilizó un equipo Perkin-Elmer® Series 200, operado mediante el software TotalChrome, que consta de un detector de matriz de fotodiodos, una bomba cuaternaria y automuestreador con un compartimento de columna termostaticado (PerkinElmer® Instruments LLC, Shelton, CT, EE.UU.). La columna empleada fue una C18 Hypersil ODS (200 x 4.6 mm) con tamaño de partícula de 5 µm (Thermo Scientific®, CA, EE.UU.). El extracto de chagalapoli se filtró con una película Millex-LG® de 0.20 µm (Unidad de filtración Millex-LG; PTFE hidrófilo, 4 mm) antes de ser inyectado al equipo. Para el análisis se aplicó la metodología descrita por Fossen *et al.* (2001), con las adecuaciones descritas por Salinas *et al.* (2005), en un sistema de gradientes lineal. Los disolventes utilizados fueron: fase A (1: 9 v/v) (ácido fórmico / agua) y fase B (1: 4: 5 v/v) (ácido fórmico / agua / metanol). La velocidad de flujo fue de 1.2 ml/min, volumen de inyección de 10 µL, con una temperatura en la columna de 30°C. Las antocianinas fueron identificadas con el uso de estándares de antocianinas y de acuerdo a lo reportado por Joaquín-Cruz *et al.*, (2015). La cuantificación de las diferentes antocianinas se realizó a partir de una curva estándar de malvidina 3-*O* galactosido (Extrashyntase, Genay, FR).

3.2.4 Microencapsulado por secado por aspersión

Los extractos de las antocianinas de chagalapoli se obtuvieron siguiendo las condiciones óptimas de extracción (etanol al 65% acidificado con HCl, pH 2.0 y un tiempo de sonicación de 30 min). El etanol fue eliminado del sistema en un rotaevaporador y el extracto concentrado para elaborar la suspensión contenía 94.90 ± 1.27 % de humedad, 11.4 ± 0.02 °Brix, 5.10 ± 1.27 % de sólidos totales, un pH de 2.72 ± 0.02 y 5.85 ± 0.06 mg equiv. a Mv3gal/mL. Se realizaron 5 tratamientos con diferentes proporciones de material de pared, uno con maltodextrina 10DE (MC1000) y otro con Capsul® (MC0100), de estos dos materiales se realizaron mezclas y se obtuvieron los tres tratamientos restantes: 75% maltodextrina y 25% Capsul (MC7525), 50% maltodextrina y 50% Capsul (MC5050), 25% maltodextrina y 75% Capsul (MC2575).

La suspensión fue preparada a una concentración final de 20% (w/v). Se utilizaron 50 g de material de pared y se disolvieron con 200 mL de agua destilada en una licuadora (marca Waring®) durante 1 minuto en velocidad baja, después de esto se adicionaron 50 mL de extracto concentrado y se homogenizó en un Ultra turrax a 18 000 rpm durante 5 minutos (Ultra Turrax® T-25-SI, IKA

Works, EE.UU.). Las suspensiones inyectadas al secador por aspersión para los 5 tratamientos exhibieron valores medios de 82.6 ± 0.3 % de contenido de humedad, 17.4 ± 0.3 % de sólidos totales y 18.2 ± 0.4 °Brix.

La encapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersión (SD-Basic Lab-Plant, Huddersfield, Reino Unido), bajo las siguientes condiciones de secado: temperatura de entrada del aire 160 ± 1 °C; temperatura de salida de aire de 95 ± 5 °C; presión de 35 Psi; diámetro de la boquilla de 0.5 mm; y un flujo de alimentación de 10 mL / min. Estas condiciones fueron seleccionadas sobre la base de las pruebas preliminares. Los polvos se colectaron en bolsas de plástico, se pesaron y se almacenaron en desecadores que contenían sílica a temperatura ambiente.

3.2.5 Caracterización de microcápsulas

3.2.5.1 Retención de antocianinas (AR) y eficiencia de encapsulación (EE)

La retención de antocianinas y la eficiencia de encapsulación se determinaron de acuerdo a la metodología empleada por García-Tejeda *et al.*, (2015). El contenido de antocianinas totales fue determinado por el método de pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001) y el resultado se expresó como mg equivalentes de Mv3G/g de microcápsulas, usando un coeficiente de extinción molar de 28 000 L/cm mol, y un peso molecular de 463.3 g/mol (Rockenbach *et al.*, 2011).

La extracción de antocianinas superficiales se determinó con el método modificado de Robert *et al.* (2010) donde 500 mg de microcápsulas se trataron con 10 mL de isopropanol. La dispersión se realizó mediante agitación con un vórtex a temperatura ambiente durante 1 min para luego filtrarse (filtro Millipore de 0.45 μ). Las variables AR y EE se calcularon con las **ecuaciones (2) y (3)**.

$$AR = \frac{TAC_e}{TAC_t} \times 100 \quad (2)$$

$$EE = 1 - \frac{SAC}{TAC_e} \times 100 \quad (3)$$

Donde TAC_e es el contenido de antocianinas totales obtenido experimentalmente, TAC_t es el contenido de antocianinas totales calculado teóricamente (2) y SAC es el contenido de antocianinas superficiales (3), todas expresadas en mg/g de microcápsulas.

3.2.5.2 Contenido de humedad y actividad de agua

El contenido de humedad de las microcápsulas fue determinado de acuerdo al método AACC No. 44-19 (AACC, 1995). La actividad de agua se midió con el equipo Aqualab® (Modelo Serie 3TE, Decagon Devices, Pullman, WA, EE.UU.).

3.2.5.3 Higroscopicidad

La higroscopicidad se determinó de acuerdo a la metodología empleada por Silva *et al.*, (2013).

3.2.5.4 Microscopía electrónica de barrido y tamaño de partícula

La morfología externa de las microcápsulas se evaluó mediante microscopía laser con un microscopio LEXT® OLS4000 3D y por microscopía electrónica de barrido (ESEM EDAX®, Detector de GSE, Holanda) acoplado con un espectrómetro de energía dispersiva (modelo XFlash® 6110, Bruker) usando un voltaje de aceleración de 15 kV. Las muestras fueron fijadas en una cinta metálica adhesiva de doble cara y se recubrieron con grafito durante un minuto de evaporación con una película de grafito de 10 a 15 nm. El software utilizado para la determinación del diámetro de las microcápsulas a través del procesamiento de las imágenes fue Image Pro-PLUS® versión 7.0 (Media Cybernetics, Inc.).

3.2.6 Análisis estadístico

Para la optimización de la extracción de antocianinas todos los tratamientos se efectuaron por duplicado y el análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurión® versión 16.1 (Manugistics Inc., Statistical Graphics Corporation, 2009, Rockville, MD, USA). Para la caracterización de las microcápsulas todos los análisis fueron realizados por triplicado. Se realizó prueba de comparación de medias (Tukey, $p < 0.05$), mediante el paquete estadístico SAS® versión 9.1

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Extracción de antocianinas

Los resultados del diseño experimental así como los resultados calculados por el modelo de superficie de respuesta se muestran en la **Tabla 7**. Los experimentos en los que se obtuvo mayor recuperación de antocianinas fueron T1, T7 y T13 donde se utilizó un pH de 2 y concentraciones de etanol entre 50 y 75%.

Tabla 7. Condiciones experimentales y contenido de antocianinas totales para la extracción de antocianinas en el fruto de ACK, utilizando un diseño Box-Behnken.

Tratamiento	pH	Concentración (%)	Tiempo de sonicación (min)	Antocianinas experimentales (mg Mv3gal/100 g)	Antocianinas esperadas (mg Mv3gal/100 g)
T1	2.0	75	30	1556.85 ± 31.34	1465.72
T2	2.5	100	30	206.30 ± 5.81	243.73
T3	3.0	50	20	651.89 ± 25.41	598.18
T4	2.0	100	20	324.53 ± 36.21	378.23
T5	3.0	75	30	822.45 ± 36.21	886.73
T6	2.5	75	20	1165.97 ± 42.76	1103.45
T7	2.0	75	10	1421.59 ± 47.07	1357.31
T8	3.0	75	10	825.37 ± 10.52	916.50
T9	3.0	100	20	190.40 ± 7.58	88.70
T10	2.5	75	20	1044.29 ± 42.89	1103.45
T11	2.5	100	10	217.85 ± 10.27	228.42
T12	2.5	75	20	1100.07 ± 21.11	1103.45
T13	2.0	50	20	1226.74 ± 3.60	1328.45
T14	2.5	50	30	1008.17 ± 13.85	997.60
T15	2.5	50	10	971.68 ± 7.35	934.26

Para obtener las condiciones óptimas de extracción se utilizó la metodología de superficie respuesta considerando la forma lineal, cuadrática y la interacción de las variables independientes estudiadas a un nivel $p \leq 0.05$. Los resultados del análisis de varianza arrojaron un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9760 que indica que el modelo cuadrático es satisfactorio para los datos experimentales y el valor de R^2 ajustada (0.9634) demuestra una alta correlación entre los valores experimentales y los valores predichos de recuperación de antocianinas.

El modelo ajustado para predecir la respuesta de la variable TAC está representado en la **Ecuación 4**, donde Y es TAC. Este modelo fue validado por análisis ANOVA antes de construir los gráficos de superficie de respuesta que se presentan en la **Figura 8**.

$$Y = 638.96 + 1103.44 x_1 - 254.95 x_2 - 364.92 x_3 + 19.66 x_1^2 + 25.25 x_1 x_2 + 110.18 x_1 x_3 - 34.54 x_2^2 - 530.31 x_2 x_3 - 12 x_3^2 \quad (4)$$

Los resultados del análisis de varianza (**Tabla 8**) para el contenido de antocianinas muestra que las variables pH y concentración de etanol fueron significativas en el proceso de extracción de antocianinas.

La variable pH tuvo un efecto significativo negativo ($p \leq 0.05$) en forma lineal, lo que significa que el incremento en el pH afecta la recuperación de antocianinas (**Figura 8-A y B**). Este comportamiento coincide con los resultados que obtuvo Rodríguez *et al.*, (2015), quienes evaluaron la variable pH en un rango de 0.5 a 6.5 para la optimización de la extracción de antocianinas en cáscaras de jaboticaba (*Myrciaria spp.*), la recuperación de antocianinas se favoreció con valores de pH menores a 3.5 y superiores a 4, observando un punto de silla, el cual no se observó en este estudio debido a que el rango de pH evaluado fue de 2 a 3, sin embargo, el comportamiento de la variable respuesta es el mismo en estos valores. Investigaciones previas demuestran que el pH tiene influencia en la estabilidad de las antocianinas, debido a que su estructura puede sufrir una transformación reversible en medios acuosos dependiendo del pH de la solución. Brevemente, a un pH de 1 predomina el catión flavilio, mientras que a valores de pH entre 2 y 4, predomina el tipo quinoidal. Entre un pH de 5 y 6, una pseudobase carbinol y una chalcona, respectivamente; pueden ser observados, y a valores de pH mayor que 7, las antocianinas se degradan en función de los grupos que los sustituyen (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Estas formas principales en equilibrio y bajo las presentes condiciones de extracción, la presencia del catión flavilio y el tipo quinoidal, formados a pH más bajo, favorece la óptima extracción de antocianinas.

Tabla 8. Análisis de varianza de las variables de proceso como términos lineal, cuadrático y sus interacciones de la optimización del proceso de extracción de antocianinas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	1.04E6	1	1.04E6	148.58	0.0000
B:Etanol	2.13074E6	1	2.13074E6	304.41	0.0000
C:Sonicación	6184.64	1	6184.64	0.88	0.3590
AA	4710.25	1	4710.25	0.67	0.4222
AB	97121.5	1	97121.5	13.88	0.0014
AC	9546.17	1	9546.17	1.36	0.2573
BB	2.07677E6	1	2.07677E6	296.70	0.0000
BC	1153.44	1	1153.44	0.16	0.6893
CC	5734.1	1	5734.1	0.82	0.3767
Error total	132992.	19	6999.56		
Total (corr.)	5.55959E6	29			

La variable concentración de etanol en su forma lineal y cuadrática tiene un efecto negativo significativo ($p \leq 0.05$) que se observa en la **Figura 8-C**, donde a medida que incrementa la concentración de etanol hasta aproximadamente un 70%, también se incrementa el contenido de antocianinas. Solo que por arriba de esta concentración las antocianinas empiezan a disminuir, y se aprecia que la mayor recuperación de antocianinas se obtiene a concentraciones de etanol de entre 60 y 70%. Estudios previos demuestran que la recuperación de antocianinas se ve favorecida cuando se usa etanol a concentraciones entre 50% y 70% (Ghafoor *et al.*, 2009, Heras *et al.*, 2013, Oancea *et al.*, 2013).

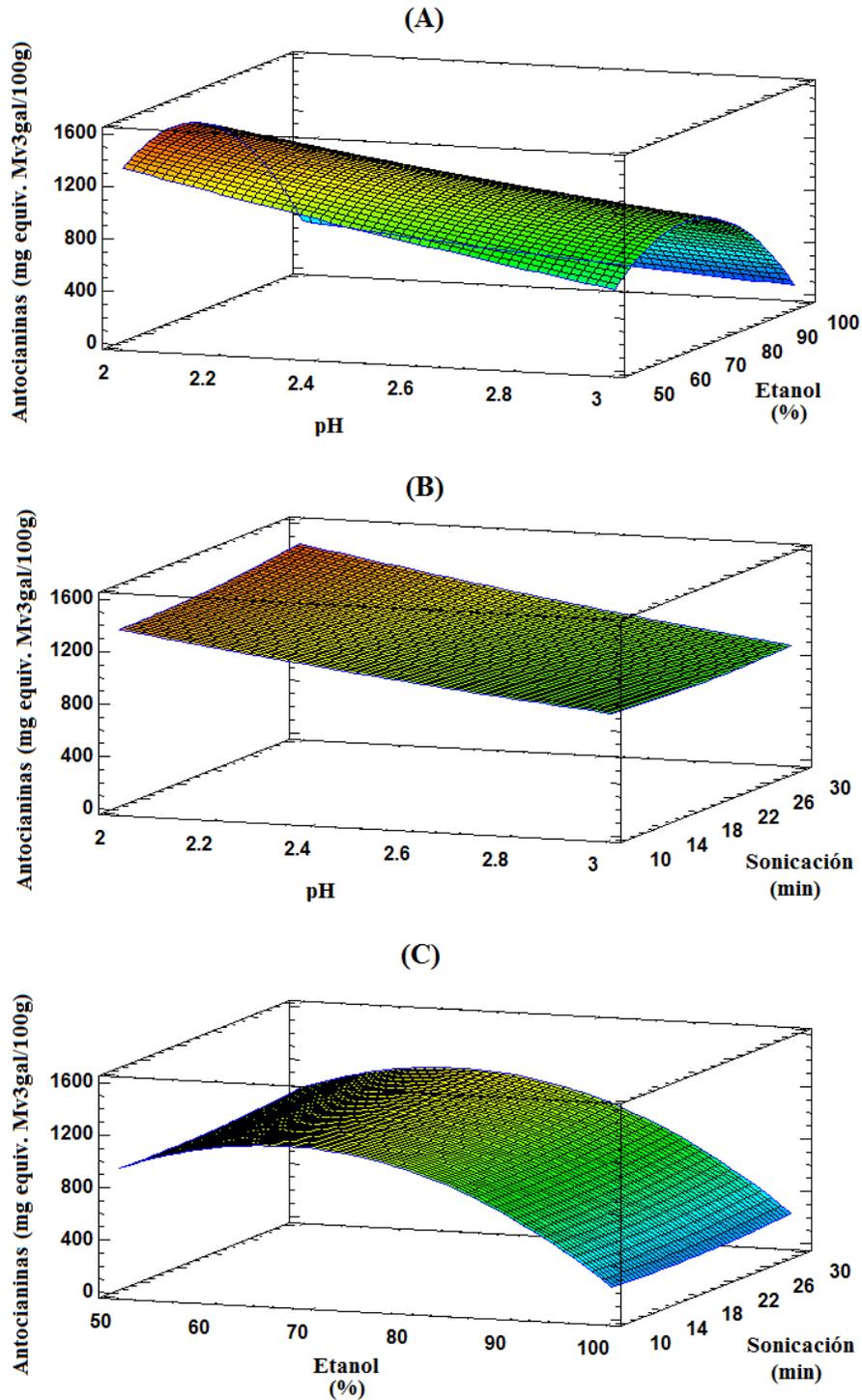


Figura 8. Superficie de respuesta estimada de la extracción de antocianinas. **A)** Relación entre el pH y etanol con un tiempo fijo de sonicado de 20 min, **(B)** la relación entre el pH y tiempo de sonicado con una concentración fija de etanol al 75% y **(C)** relación entre la concentración de etanol y el tiempo de sonicado con un pH fijo de 2.5.

El tiempo de sonicado no mostró efecto significativo sobre la recuperación de antocianinas. La mejor condición para la extracción de antocianinas fue con etanol 63.51% (v/v), pH de 2.0 y un tiempo de sonicación de 30 min.

El punto óptimo fue verificado de forma experimental y se obtuvo una recuperación de antocianinas de 1545.45 ± 16.34 mg equivalentes a Mv3gal/100g de tejido fresco (777.79 ± 8.10 mg eq. cianidina-3-glucosido/100 g), este resultado es similar al que reportó Joaquín-Cruz *et al.*, (2015) en este mismo fruto (796.0 ± 2.3 mg equivalentes a cianidina-3-glucosido/100 g de tejido fresco), donde su sistema de extracción consistió en dos extracciones sucesivas, la primera usando metanol acidificado al 1% con ácido trifluoroacético y la segunda extracción con una solución de metanol: ácido acético: agua (10:1:9). Bajo las condiciones de extracción optimizadas en el presente estudio se logró un resultado similar, solo que con una sola extracción y utilizando sustancias seguras para uso en alimentos (clasificación GRAS).

3.3.2 Identificación de las antocianinas por HPLC.

El cromatograma de la **Figura 9** revela la presencia de 12 antocianinas en el extracto de ACK y confirma que la antocianina que se encuentra en mayor proporción es la malvidina 3-*O*-galactosido (pico 9) seguida de petunidina 3-*O*-arabinosido (pico 6) y delphinidina 3-*O*-galactosido (pico 1). Estos resultados son similares a los informados por Joaquín-Cruz *et al.*, (2015) quienes analizaron las antocianinas del chagalapoli.

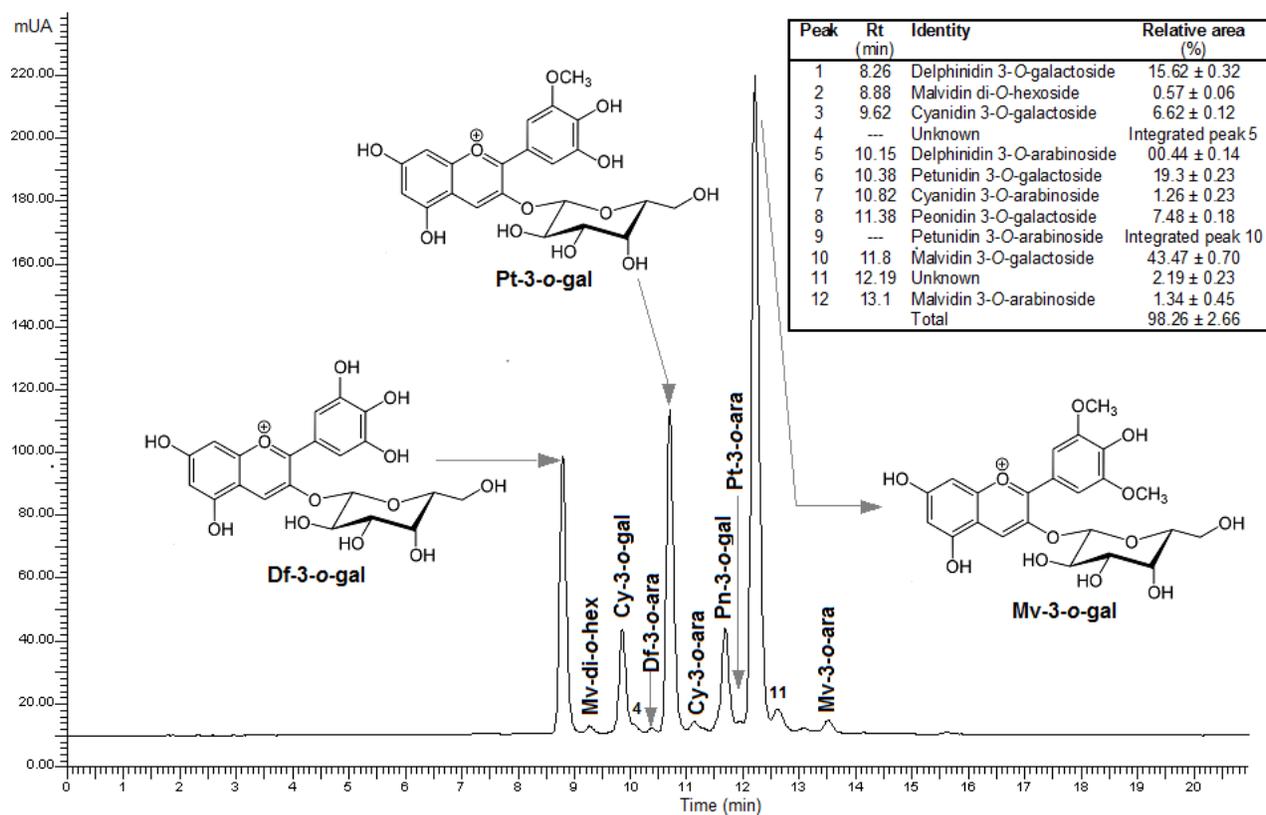


Figura 9. Cromatograma del extracto etanólico de fruto fresco de chagalapoli obtenido por HPLC

3.3.3 Caracterización de las microcápsulas

Los polvos producidos mostraron un color rosa intenso en todos los tratamientos (**Figura 20** en anexo **A3**), sus características fisicoquímicas se muestran en la **Tabla 9**.

3.3.3.1 Retención de antocianinas

En los cinco tratamientos probados se observó un aumento en la retención de antocianinas con el incremento de la proporción de Capsul en la mezcla. Los tratamientos con mayor AR fueron MC5050, MC2575 y MC0100.; los resultados variaron de 95.60 %, para el tratamiento MC1000, a 99.47%, en el tratamiento MC0100. Lograr una retención mayor a 80% es importante en términos de producción industrial del pigmento (Silva *et al.*, 2014). La AR en los tratamientos que contienen Capsul fueron mayores a lo obtenido por Silva *et al.*, (2013) en la encapsulación de antocianinas de jaboticaba (79.92%), en tanto que los resultados de los tratamientos que contenían únicamente maltodextrinas fueron similares a los obtenidos por Souza *et al.* (2015) al evaluar diferentes concentraciones de maltodextrinas y con diferentes temperaturas de secado, sus resultados

presentados fueron de 88.36% a 97.35%, los cuales aumentaron al incrementarse la temperatura (de 150 a 170 °C) y la concentración de maltodextrinas (20 al 30%).

Tabla 9. Características fisicoquímicas de las microcápsulas de chagalapoli obtenidas con diferentes mezclas de maltodextrina:Capsul.

Tratamiento	AR (%)	EE (%)	MC (%)	a _w	H (g/100 g)
MC1000	95.60 ± 0.76 ^b	99.40 ± 0.00 ^b	1.83 ± 0.12 ^c	0.15 ± 0.01 ^a	13.81 ± 0.07 ^a
MC7525	95.71 ± 0.92 ^b	99.65 ± 0.02 ^a	2.63 ± 0.07 ^a	0.13 ± 0.01 ^{ab}	13.15 ± 0.11 ^b
MC5050	98.27 ± 0.55 ^a	99.66 ± 0.01 ^a	2.47 ± 0.19 ^{ab}	0.13 ± 0.01 ^{ab}	11.48 ± 0.32 ^c
MC2575	99.25 ± 0.85 ^a	99.65 ± 0.01 ^a	2.74 ± 0.40 ^a	0.11 ± 0.00 ^b	11.42 ± 0.11 ^c
MC0100	99.47 ± 0.19 ^a	99.67 ± 0.01 ^a	1.89 ± 0.01 ^{bc}	0.13 ± 0.00 ^{ab}	10.82 ± 0.07 ^d
DMS (0.05)	1.934	0.0311	0.6285	0.0193	0.4889

¹Media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Tratamientos MC1000: maltodextrina 100%; MC7525: mezcla de maltodextrina 75%-Capsul 25%; MC5050: mezcla de maltodextrina 50%-Capsul 50%; MC2575: mezcla de maltodextrina 75%-Capsul 25%; MC0100: Capsul 100%.

3.3.3.2 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulado (EE) en todos los tratamientos fue superior a 99 % y las diferencias entre tratamientos se apreciaron a nivel de fracción de punto porcentual. No obstante se observó que los tratamientos con Capsul en su formulación fueron estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$) y mayores que el que contenía únicamente maltodextrinas (**Tabla 9**). Idham *et al.* (2012) reportaron 99.69% en la encapsulación de antocianinas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con maltodextrinas, valor similar al obtenido en este estudio. Sin embargo, los resultados en todos los tratamientos que contuvieron Capsul son elevados en relación a lo obtenido por Silva *et al.* (2014), que obtuvieron 87.6 % en la encapsulación de aceite de café verde con maltodextrinas 10DE (25%): Capsul (75%). El uso de únicamente Capsul como material de pared en el microencapsulado de licopeno utilizando 5, 10 y 15% de material activo (Rocha *et al.*, (2012), condujo a EE de 21.01% a 29.73%, valores muy inferiores a los obtenidos en este estudio (99.65 a 99.67%). Para la encapsulación de aceite de naranja con almidón succinatado de maíz ceroso se obtuvieron eficiencias de encapsulación de 98.82% con una concentración del 20% de material encapsulante (Verdalet-Guzman *et al.*, 2013), resultados parecidos a los del presente trabajo. En general, los resultados evidencian que Capsul muestra mejor eficiencia de encapsulación que la maltodextrina y es una buena alternativa para la encapsulación de antocianinas.

3.3.3 Contenido de humedad y actividad de agua

La actividad de agua (a_w) y contenido de humedad (MC) son parámetros de referencia en el procesamiento y almacenamiento de alimentos porque están directamente relacionados con su estabilidad.

La proporción de maltodextrina: Capsul afectó significativamente ($p \leq 0.001$) las variables de MC y la a_w . Los valores observados en MC variaron de 1.83% a 2.74% (**Tabla 9**). No se observó un efecto claro de la proporción de maltodextrina y Capsul en esta variable, ya que los menores valores correspondieron a las microcápsulas en las que se utilizaron solos estos materiales de pared. Los valores obtenidos son menores a los reportados por Silva *et al.*, (2013) en microcápsulas de antocianinas de jaborcabe con 4.84% para maltodextrina y 5.33% para la mezcla de maltodextrina-Capsul (17.7:83.3), con las mismas condiciones de secado. La a_w de las microcápsulas osciló entre 0.11 y 0.15. Estos valores son similares a los reportados por García-Tejeda *et al.* (2015) de 0.19 y 0.26 para las microcápsulas de antocianinas elaboradas con almidones modificados a partir de maíz normal y maíz ceroso. La a_w está directamente relacionada con la degradación de sustancias químicas, mientras más alta sea (más cercana a 1), menor será su estabilidad (Maltini *et al.*, 2003). En el caso particular de las microcápsulas, las variables MC y a_w dependen de la temperatura de secado: cuanto mayor sea la temperatura, menor será MC y el valor de a_w (Frascareli *et al.*, 2012), pero una mayor temperatura afecta la estabilidad de estos compuestos (Ersus y Yurdagel, 2007).

Los valores de MC y a_w obtenidos en los diferentes tratamientos de material de pared en las microcápsulas de antocianinas de chagalapoli son favorables para su almacenamiento y conservación ya que limitan las reacciones químicas involucradas en su degradación (Tonon *et al.*, 2009, Maltini *et al.*, 2003).

3.3.3.4 Higroscopicidad

La higroscopicidad de las microcápsulas decreció al incrementarse la proporción de Capsul en los tratamientos (**Tabla 9**). La mayor higroscopicidad se presentó en los tratamientos con mayor proporción de maltodextrina, lo que se atribuye a la propiedad higroscópica de la maltodextrina, en combinación con el carácter hidrofóbico del Capsul. En el caso de los polvos de pura maltodextrina y MC7525, se apreciaron de un color más intenso debido a la solubilización de las partículas (**Figura 21** del anexo A3).

Los resultados sobre H obtenidos para las microcápsulas de los diferentes tratamientos de material de pared son parecidos a los de Silva *et al.*, (2013) para antocianinas de jaboticaba cuando emplearon mezclas de maltodextrina y Capsul. En general se busca que la H de los polvos sea baja para evitar que durante el almacenamiento las microcápsulas se reblandezcan al absorber la humedad del ambiente, y pierdan con ello su carácter protector hacia agentes externos como oxígeno, luz y radicales libres, que degradan a las antocianinas (Silva *et al.*, 2013).

3.3.3.5 Morfología de las Microcápsulas

La **Figura 10** muestra las microfotografías SEM de los polvos producidos. Las microcápsulas exhibieron forma esférica y diversos tamaños, que es una característica típica de los polvos secados por pulverización. Las mezclas de diferentes materiales de pared influyen en la morfología de las microcápsulas, esto es más evidente cuando se comparan las imágenes de la maltodextrina con los otros tratamientos, la maltodextrina exhibe microesferas más pequeñas con una superficie más lisa y menos rugosa. Características morfológicas similares fueron encontradas por Silva *et al.* (2013), Tonon *et al.*,(2009) y Villacrez *et al.*, (2014). La morfología esferoidal y lisa de las microcápsulas de maltodextrina está probablemente relacionada con el contenido de azúcares de bajo peso molecular en el material de la pared, los que pueden actuar como un plastificante y prevenir la contracción de la superficie durante el secado (Loksuwan, 2007). La rugosidad de la superficie de las microcápsulas se atribuye a la contracción de las partículas debido a la pérdida drástica de humedad y el enfriamiento (Saenz *et al.*, 2009, Tonon *et al.*, 2009).

Las microcápsulas mostraron un diámetro promedio de 5.07 μm (MC1000), 5.29 μm (MC7525), 6.67 μm (MC5050), 5.82 μm (MC2575) y 6.1 μm (MC0100). Estos diámetros de partícula son cercanos al diámetro promedio de 10.94 μm reportado por Tonon *et al.*, (2009) para microcápsulas de maltodextrina 10 DE.

Según Barros y Stringheta (2006), las paredes de microesferas intactas y más regulares resultan en un proceso de microencapsulación más adecuado ya que las microcápsulas de superficies rugosas tienen áreas de contacto mayores que aquellas con superficie lisa, lo que puede hacerlas más susceptibles a reacciones de degradación (Tonon *et al.*, 2009).

Si se considera la forma de las microcápsulas, el mejor material para obtenerlas es la maltodextrina, sin embargo los resultados de retención de antocianinas, eficiencia de encapsulación e higroscopicidad son mejores en los tratamientos con Capsul.

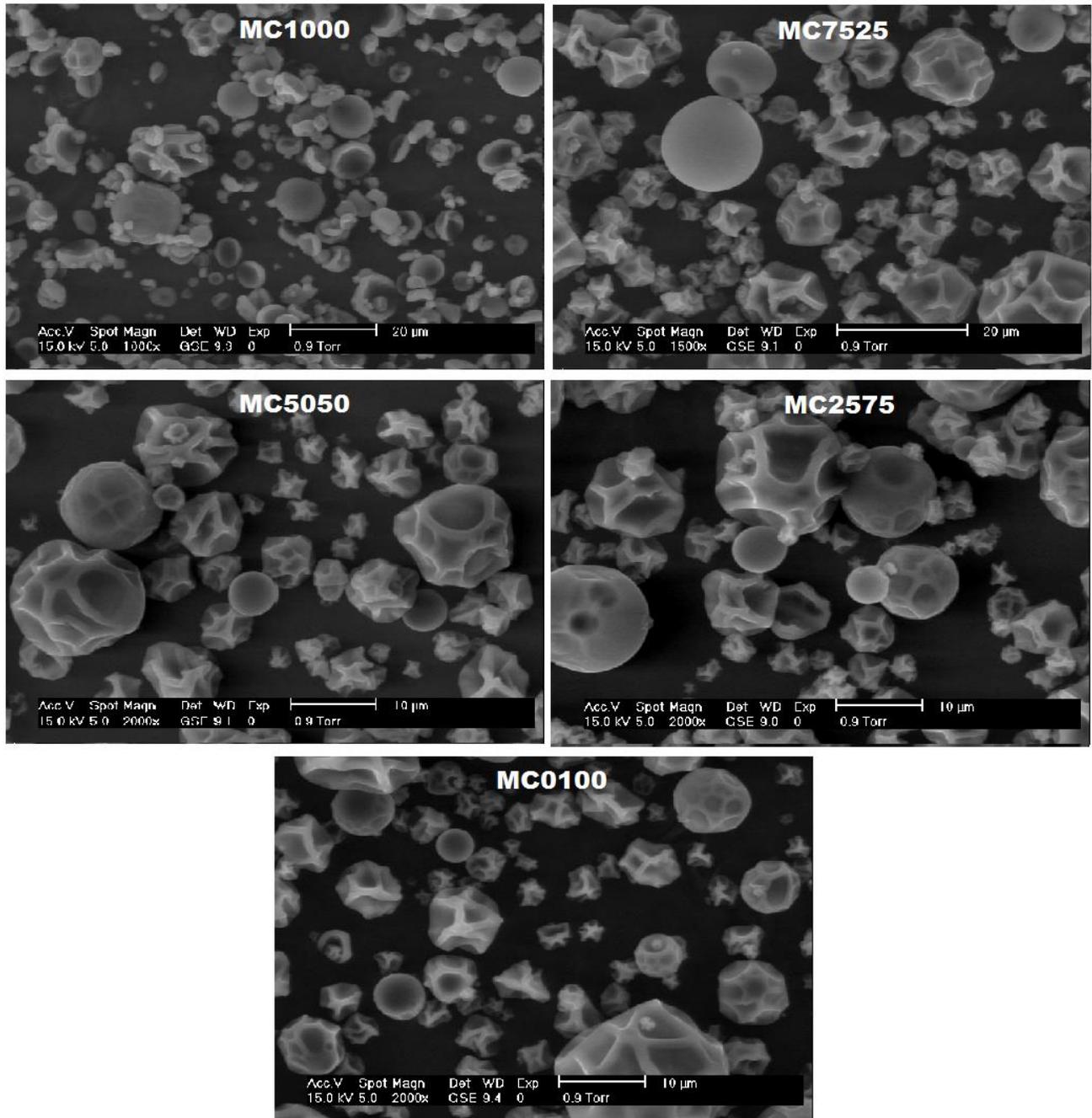


Figura 10. Estructura externa de microcápsulas de antocianinas producidas a partir de diferentes combinaciones de materiales de pared: MC1000: Maltodextrina, MC7525: Maltodextrina- Capsul (75:25), MC5050: Maltodextrina-Capsul (50:50), MC2575: Maltodextrina-Capsul (25:75), y MC0100: Capsul

3.4 CONCLUSIONES

De las variables estudiadas para optimizar el proceso de extracción de antocianinas a partir del fruto chagalapoli, únicamente la concentración de etanol y el pH fueron significativas para el modelo obtenido que mostró un elevado ajuste con los datos experimentales ($R^2=0.9760$). El proceso de extracción optimizado consiste en utilizar etanol al 63.5%, un pH de 2 y un tiempo de sonicado de 30 min, con una relación pulpa de fruto:solvente de 1:5 peso/volumen. Bajo las condiciones optimizadas se obtuvieron 1545.45 ± 16.34 mg equivalentes de Mv3gal/100 g de tejido fresco. Las antocianinas del fruto chagalapoli obtenidas bajo estas condiciones se pueden encapsular con una mezcla de Capsul:maltodextrina 50:50, con una alta eficiencia de encapsulación (99%) y retención de antocianinas (>95%) y características de las microcápsulas de higroscopicidad, contenido de humedad y actividad de agua favorables para su almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

V.A.G agradece a Juan Vélez, Eleazar Urbina y Verónica Flores del CINVESTAV Querétaro por el apoyo técnico brindado en esta investigación.

REFERENCIAS

- AACC, 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th ed. International, St. Paul, MN, Method. 44-19.
- Arrazola, G., Herazo, I. & Alvis, A. 2014. Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante. *Información tecnológica*, 25, 31-42. DOI: 0.4067/S0718-07642014000300006.
- Barros, F.A.R.d., Stringheta, P.C., 2006. Microencapsulamento de antocianinas – uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. *Biociencia*, 36, 18–24d
- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C. R. & Boirdignon-Luiz, M. T. 2011. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 186-193. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02486.x
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. D., Paez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A. & Galan-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- Celli, G. B., Ghanem, A. & Brooks, M. S.-L. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using Response Surface

- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I. & Marin-Arroyo, M. R. 2013. Optimization of a wall material formulation to microencapsulate a grape seed extract using a mixture design of experiments. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 941-951. DOI: 10.1007/s11947-012-0848-z
- De Brito, E. S., De Araujo, M. C. P., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A. & Novotny, J. A. 2007. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolao, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9389-9394. DOI: 10.1021/jf0715020
- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., Cenkier, J. & Swirydow, E. 2015. Selected properties of microencapsulated oil powders with commercial preparations of maize OSA starch and trehalose. *Journal of Food Engineering*, 152, 72-84. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.09.034
- Ersus, S. & Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z. & Chen, D. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *Lwt-Food Science and Technology*, 41, 155-160. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.01.019
- Fossen, T., Slimestad, R. & M., A. O. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarigrass (*Phalaris arundinacea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2318-2321. DOI: 10.1021/jf001399d
- Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V. & Hubinger, M. D. 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioprocess Processing*, 90, 413-424. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.12.002
- Galaffu, N., K. Bortlik, M. Michel. 2015. 5-An industry perspective on natural food colour stability. In: *Colour Additives for Foods and Beverages*, page 91–130
- Garcia-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y. & Martinez-Bustos, F. 2015. Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food and Bioprocess Processing*, 94, 717-726. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.10.003
- Garofulic, I. E., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A. R. & Jukic, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117, 437-442. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.043
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y. & Jo, I. H. 2009. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4988-4994. DOI: 10.1021/jf9001439
- Ghafoor, K., Hui, T. & Choi, Y. H. 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 735-746. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2010.00413.x

- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.* 14, 217–225. DOI: 10.1016/s1369-703x(02)00221-8
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy, New York.
- Hategekirnana, J., Masamba, K. G., Ma, J. & Zhong, F. 2015. Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. *Carbohydrate Polymers*, 124, 172-179. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.01.060.
- Heras, I., Alvis, A. & Arrazola, G. 2013. Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). *Información tecnológica*, 24, 93-102. DOI: 10.4067/s0718-07642013000500011
- Idham, Z., Muhamad, I. I. & Sarmidi, M. R. 2012. Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from hibiscus sabdariffa l. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 522-542. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2010.00605.x
- Joaquin-Cruz, E., Duenas, M., Garcia-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C. & Garcia-Salinas, C. 2015. Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151-157. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.01.033
- Lapornik, B., Prosek, M. & Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036
- Loksuwan, J. 2007. Characteristics of microencapsulated beta-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.10.011
- Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P. & Moontree, T. 2015. Ohmic heating-assisted extraction of anthocyanins from black rice bran to prepare a natural food colourant. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 102-110. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.12.009
- Maltini, E., Torreggiani, D., Venir, E. & Bertolo, G. 2003. Water activity and the preservation of plant foods. *Food Chemistry*, 82, 79-86. DOI: 10.1016/s0308-8146(02)00581-2.
- Oancea, A. S., Stoia, M., Grosu, C. & Ketney, O. 2013. Conventional and ultrasound assisted extraction of anthocyanins from blackberry and seet cherry cultivars. *Acta Chim. Slov.*, 60, 383-389.
- Pedro, A. C., Granato, D. & Rosso, N. D. 2016. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chemistry*, 191, 12-20. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.045
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J. & Saenz, C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1386-1394. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x

- Rocha, G. A., Favaro-Trindade, C. S. & Ferreira Grosso, C. R. 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 37-42. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.01.001
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., De Souza Schmidt Goncalves, A. E. & Fett, R. 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127, 174-179. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.137
- Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A. D. & Narain, N. 2015. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel. *Industrial Crops and Products*, 69, 400-407. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.02.059
- Sáenz, C., Tapia, S., Chávez, J. & Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616-622. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.095
- Salinas, M. Y., Sanchez, G. S., Hernandez, D. R. & Lobato, N. R. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*, 43, 483-487.
- Shenoy, V. R. 1993. Anthocyanins - Prospective Food Colors. *Current Science*, 64, 575-579.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teofilo, R. F. & 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, 538-544. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.08.039
- Silva, V. M., Vieira, G. S. & Hubinger, M. D. 2014. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International*, 61, 132-143. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.052
- Souza, V. B. d., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro, J. C. & Favaro-Trindade, C. S. 2015. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, 93, 39-50. DOI: 10.1016/j.fbp.2013.11.001
- Swamy, G. J., Sangamithra, A. & Chandrasekar, V. 2014. Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64-74. DOI: 10.1016/j.dyepig.2014.05.028
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P. & Hubinger, M. D. 2009. Physicochemical and morphological characterisation of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950-1958. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02012.x
- Tonon, R.V., Brabet, C., 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, 907-914. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.12.013
- Turchiuli, C., Fuchs, M., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N. & Dumoulin, E. 2005. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration.

Innovative Food Science & Emerging Technologies, 6, 29-35. DOI: 10.1016/j.ifset.2004.11.005

Verdalet-Guzman, I., Martinez-Ortiz, L. & Martinez-Bustos, F. 2013. Characterization of new sources of derivative starches as wall materials of essential oil by spray drying. *Food Science and Technology*, 33, 757-764. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013000400023>

Villacrez, J. L., Carriazo, J. G. & Osorio, C. 2014. Microencapsulation of Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) Aqueous Extract by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1445-1456. DOI: 10.1007/s11947-013-1172-y

CAPÍTULO IV. ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS MICROENCAPSULADAS DEL CHAGALAPOLI (*Ardisia compressa* k.) EN UNA BEBIDA ISOTÓNICA

María Vianey Antonio-Gómez^a, Yolanda Salinas-Moreno^b, Francisco Hernández-Rosas^{a,*}, Andrés Herrera-Corredor^a, Adriana Contreras-Oliva^a

^a*Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Postgrado Innovación Agroalimentaria Sustentable. Km 348 Carretera Córdoba-Veracruz. 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz.*

^b*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo experimental Centro Altos de Jalisco, Km 8 Carretera Tepatitlán-Lagos de Moreno. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. CP 47600.*

Autor de correspondencia: Francisco Hernandez Rosas

E-mail: fhrosas@colpos.mx

Teléfono: ++52 271 131 5840

Este artículo se enviará a la revista Food Science.

RESUMEN

Debido a la creciente demanda de pigmentos naturales en la industria alimenticia se evaluó la estabilidad de las antocianinas microencapsuladas de chagalapoli (*A. compressa*) en una bebida isotónica bajo dos condiciones de temperatura (4 y 25°C) y en ausencia de luz. Los materiales de pared utilizados en las microcápsulas fueron maltodextrina y Capsul en una mezcla 25% y 75% respectivamente. La degradación de las antocianinas siguió una cinética de primer orden en las condiciones evaluadas. La estabilidad de las antocianinas (k , $t_{1/2}$ y RA) fue afectada significativamente ($p < 0.0001$) por la temperatura, a 4°C la bebida con microcápsulas mostró mejor estabilidad con RA de $91.2 \pm 0.28 \%$ y $t_{1/2}$ 6019.5 hrs, mientras que a 25°C una RA de 53.72 ± 0.27 y $t_{1/2}$ 1003.3 hrs. Los parámetros de color (L^* , C^* y hue) tuvieron un efecto altamente significativo ($p > 0.0001$) por el tiempo y la temperatura. La diferencia de color en las bebidas con las antocianinas microencapsuladas fue más evidente de forma visual en la que se almacenó a 25°C (8.58) que a 4°C (3.81). El pigmento de chagalapoli puede ser utilizado en bebidas isotónicas almacenadas a una temperatura de 4°C.

Palabras clave: microencapsulación, secado por aspersión, Capsul.

4.1 INTRODUCCIÓN

El color es una de las propiedades más importantes de los alimentos y es un factor que influye en la aceptación de los consumidores (Falcao *et al.*, 2008, Todaro *et al.*, 2009). El reemplazo de colorantes sintéticos por naturales como aditivos alimentarios ha incrementado sustancialmente (Galaffu *et al.*, 2015, Gras *et al.*, 2015). Las antocianinas son consideradas como potenciales sustitutos de colorantes sintéticos debido a los colores brillantes y atractivos que confieren a los alimentos (Falcao *et al.*, 2008), además de sus propiedades antioxidantes como valor agregado e importante en la prevención de muchas enfermedades degenerativas (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009, Shipp y Abdel-Aal, 2010).

Las antocianinas forman parte de los compuestos flavonoides, son inocuos y de fácil incorporación en medios acuosos, haciéndolos atractivos como colorantes solubles en agua (Giusti and Wrolstad, 2003). Sin embargo, la estabilidad de estas moléculas puede verse afectada por varios factores, tales como el pH, la temperatura de almacenamiento, la luz, el oxígeno, los disolventes, etc. Su estabilidad puede ser evaluada mediante el estudio de su degradación durante el almacenamiento en forma de extracto, polvo o incorporada en un alimento. Varios estudios han demostrado que generalmente la degradación de antocianinas sigue una cinética de primer orden, es decir, el contenido de antocianina disminuye con el tiempo (Idham *et al.*, 2012, Tonon *et al.*, 2010). Durante muchos años se ha usado la microencapsulación de ingredientes que son susceptibles a la degradación por agentes externos (de Souza *et al.*, 2014).

La microencapsulación por secado por aspersion es una tecnología usada en la industria de alimentos para mejorar la estabilidad de pigmentos naturales durante su almacenamiento, produce polvos con baja humedad que son fáciles de almacenar y reduce al mínimo el peso para el transporte en comparación con los líquidos concentrados (Burin *et al.*, 2011; Obon *et al.* 2009).

Ardisia compressa es una frutilla con alto contenido de antocianinas y alta capacidad antioxidante, está compuesta por doce antocianinas, principalmente por malvidina 3-o-galactosido, petunidina 3-o-galactosido y delphinidina 3-o-galactosido (Joaquin-Cruz *et al.*, 2015). Su contenido de antocianinas es de 796 mg equivalentes a Cy3G/ 100 g de peso fresco, mayor al que contiene la berenjena (Todaro *et al.*, 2009), la papa morada (Xu *et al.*, 2015) y la zanahoria morada (Ersus y Yurdagel, 2007) que son comúnmente usadas en la industria alimentaria como fuente de colorantes.

No obstante el chagalapoli representa una fuente de obtención de pigmentos naturales, sin embargo el color y la estabilidad de sus antocianinas para uso en alimentos no ha sido caracterizada.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la estabilidad del pigmento de antocianinas microencapsuladas con maltodextrinas y Capsul® incorporadas en una bebida isotónica. La estabilidad fue evaluada durante 42 días de almacenamiento de la bebida con base en la influencia de la temperatura sobre las antocianinas, en términos de tiempo de vida media, retención de antocianinas y color.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Reactivos y material vegetal

Las sustancias químicas usadas incluyeron: etanol (Baker®), ácido clorhídrico (Baker®), ácido fórmico (Brand®) y metanol (Baker®), grado reactivo analítico. También se usaron agua y metanol grado HPLC para el análisis de las antocianinas. Los estándares comerciales de malvidina 3-O-galactosido y delfinidina 3-o-galactosido fueron adquiridos de Extrasynthese (Genay, Francia). Los materiales de pared usados fueron Capsul® (National Starch, USA) y maltodextrina 10 DE (IMMSA, S.A de C.V).

El material vegetal consistió de frutos maduros de chagalapoli (*A. compressa*) que fueron obtenidos en el mercado regional de San Andrés Tuxtla, Veracruz. El hueso se eliminó del fruto y la pulpa fue homogenizada con un equipo Ultra Turrax (básico T-10, IKA, USA) durante un minuto a una velocidad de 20 450 rpm.

4.2.2 Obtención del extracto de antocianinas

La muestra homogenizada se mezcló en una proporción 1:5 (muestra:solvente) con etanol al 65% acidificado (pH 2.0) con ácido clorhídrico y fue sonicada en un baño ultrasónico (modelo 2510, Branson) durante 30 minutos, después de esto se agitó durante 30 min en un agitador horizontal a temperatura ambiente (~25 °C) y con protección a la luz. El extracto fue recuperado al centrifugar (centrifuga Modelo Universal 32, Hettich) la muestra a 2200 g por 10 min, finalmente se concentró en un evaporador rotatorio (R-215, Buchi, Rose Scientific Ltd, Canada) a una temperatura máxima de 40 °C hasta que el volumen fue reducido a un tercio del inicial para eliminar el etanol del sistema. El extracto concentrado contenía 94.90 ± 1.27 % de humedad, 11.4 ± 0.02 °Brix, 5.10 ± 1.27 % de sólidos totales y un pH de 2.72 ± 0.02 .

4.2.3 Obtención del pigmento por secado por aspersión

La suspensión fue preparada a una concentración final de 20% (w/v). Se utilizaron 50 g de material de pared (25% de maltodextrina 10DE y 75% de Capsul®) y se disolvieron con 200 mL de agua destilada en una licuadora (marca Waring) durante 1 minuto en velocidad baja, después de esto se homogenizó en un Ultraturrax a 18 000 rpm durante 5 minutos (Ultra Turrax T-25-SI, IKA Works, EE.UU.) y se adicionaron 50 mL de extracto concentrado, se continuo homogenizándose durante 10 minutos más. La suspensión inyectada al secador por aspersión contenía $82.9 \pm 0.08\%$ de humedad, $17.1 \pm 0.08\%$ de solidos totales y 18.5 ± 0.06 °Brix.

La encapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersión (SD-Basic Lab-Plant, Huddersfield, Reino Unido), bajo las siguientes condiciones de secado: temperatura de entrada del aire $160 \pm 1^\circ\text{C}$; temperatura de salida de aire de $95 \pm 5^\circ\text{C}$; presión de 35 Psi; diámetro de la boquilla de 0.5 mm; y un flujo de alimentación de 10 mL / min. Estas condiciones fueron seleccionadas con base en las pruebas preliminares. Los polvos se colectaron en bolsas de plástico, se pesaron y se almacenaron en refrigeración dentro de desecadores con silica. El pigmento en polvo presentó las siguientes características: $2.74 \pm 0.40\%$ de humedad, 0.11 ± 0.00 de actividad de agua y su contenido de antocianinas totales fue de 10.74 ± 0.24 mg equivalente a Mv3gal/g.

4.2.4 Evaluación de la estabilidad del pigmento en la bebida isotónica

Se prepararon dos bebidas isotónicas de acuerdo con la formulación empleada por Gironés-Vilaplana *et al.* (2014), una fue adicionada con pigmento de extracto líquido concentrado de antocianinas y otra con pigmento microencapsulado de antocianinas. El color fue igualado con el de una bebida comercial a través de los parámetros CIELab. Las bebidas fueron almacenadas en tubos de ensayo de vidrio de 50 mL, tapados y recubiertos con aluminio, en refrigeración a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y en una incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Binder® GmbH, Tuttlingen, Alemania) para evaluar el efecto de la temperatura en relación con la degradación de las antocianinas. Los tratamientos evaluados fueron: bebida con pigmento en extracto líquido almacenada a 4°C (BE4) y a 25°C (BE25), bebida adicionada con pigmento microencapsulado almacenado a 4°C (BM4) y a 25°C (BM25). El contenido de antocianinas totales, pH, solidos solubles y color fueron determinados cada semana durante 42 días.

Siguiendo la metodología descrita por Burin *et al.* (2011), se graficó el logaritmo del contenido de antocianinas totales en función del tiempo para cada tratamiento, la constante cinética de primer

orden (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las antocianinas contenidas en la bebida se obtuvieron mediante las **ecuaciones 4 y 5**.

$$\text{Pendiente de la recta} = -k/2.303 \quad (4)$$

$$t_{1/2} = -\ln 0.5 \times k^{-1} \quad (5)$$

El porcentaje de retención de antocianinas fue calculado con la **ecuación 6** (Burin *et al.*, 2011). Donde A_t y A_0 es la absorbancia al tiempo t y al tiempo cero, respectivamente.

$$RA(\%) = \left(\frac{A_t}{A_0}\right) 100 \quad (6)$$

4.2.4.1 Mediciones a la bebida

Las muestras fueron filtradas con un papel filtro Whatman No. 4 y posteriormente se les midió color, pH, grados Brix y contenido de antocianinas.

Color: La muestra se colocó en el recipiente de cristal transparente (Accesorio 04-7209-00, HunterLab, Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia, EE.UU.) y se cubrió con la cubierta metálica negra (Accesorio 04-4000-00, HunterLab, Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia, EE.UU.) para evitar la difusión de la luz. Se obtuvieron los parámetros $L^*a^*b^*$ con un colorímetro HunterLab® (Modelo MiniScan, Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia, EE.UU.), a partir de esto se obtuvo la saturación (C^*) con la **ecuación 8** y el Angulo de tono (hue) con la **ecuación 7**.

$$\text{hue} = \tan^{-1} \left(\frac{b}{a}\right) \quad (7)$$

$$C^* = (a^2 + b^2) \quad (8)$$

Se calcularon los valores de diferencia de color (ΔE) para conocer los cambios de color en la bebida en el tiempo. ΔE se definió como: $\Delta E = [(L_i - L_0)^2 + (a_i - a_0)^2 + (b_i - b_0)^2]^{0.5}$, donde L_0 , a_0 y b_0 son los valores de las muestras al tiempo cero y L_i , a_i y b_i son los valores medidos con el tiempo.

Solidos solubles y pH: los grados Brix se midieron con un refractómetro (modelo PAL-3®, Atago Co. LTD., Tokio, Japón). El pH con un potenciómetro (Serie 45φ, Beckman Coulter®, Inc., CA, EE.UU.).

Contenido de antocianinas totales (TAC): se determinó conforme a la metodología empleada por Salinas *et al.* (2005). El TAC se expresó en función de malvidina 3-O-galactosido (Extrasintese, Genay, FR), con la cual se elaboró una curva patrón. Se preparó una curva estándar de Malvidina 3-O-galactosido (Mv3gal). Los resultados se expresaron como μg equivalentes de Mv3gal/ mL de bebida

4.2.5 Análisis de antocianinas en el extracto de chagalapoli por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se cuantificaron las antocianinas presentes en la bebida al inicio y al final del periodo de almacenamiento. Se utilizó un equipo Perkin-Elmer® Series 200, operado mediante el software TotalChrome, que consta de un detector de matriz de fotodiodos, una bomba cuaternaria y automuestreador con un compartimento de columna termostaticado (PerkinElmer® Instruments LLC, Shelton, CT, EE.UU.). La columna empleada fue una C18 Hypersil ODS (200 x 4.6 mm) con tamaño de partícula de 5 μm (Thermo Scientific®, CA, EE.UU.). El extracto de chagalapoli se filtró con una película Millex-LG® de 0.20 μm (Unidad de filtración Millex-LG; PTFE hidrófilo, 4 mm) antes de ser inyectado al equipo. Para el análisis se aplicó la metodología descrita por Fossen *et al.* (2001), con las adecuaciones descritas por Salinas *et al.* (2005), en un sistema de gradientes lineal. Los disolventes utilizados fueron: fase A (1: 9 v/v) (ácido fórmico / agua) y fase B (1: 4: 5 v/v) (ácido fórmico / agua / metanol). La velocidad de flujo fue de 1.2 mL/min, volumen de inyección de 10 μL , con una temperatura en la columna de 30°C. Las antocianinas fueron identificadas con el uso de estándares de antocianinas y de acuerdo a lo reportado por Joaquín-Cruz *et al.*, (2015). La cuantificación de las diferentes antocianinas se realizó a partir de una curva estándar de malvidina 3-O galactosido (Extrashyntase, Genay, FR).

4.2.7 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada temperatura. Se realizó el análisis de regresión lineal con Excel 2007 para obtener las constantes de velocidad en los estudios cinéticos de la degradación de las antocianinas en las bebidas isotónicas. La comparación de medias de los resultados fue realizado a través de la prueba de Tukey, el grado de importancia entre las diversas constantes se analizaron mediante análisis de varianza de $p < 0.05$ y el análisis de correlación de Pearson entre las variables medidas en la bebida fueron realizados con el software SAS® versión 9.1.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Estabilidad de las antocianinas

La estabilidad de las antocianinas sin encapsular y las encapsuladas con Maltodextrina y Capsul añadidas a una bebida isotónica se estudió bajo diferentes condiciones de temperatura, las curvas de degradación se muestran en la **Figura 11**. El contenido de antocianinas en todas las bebidas en estudio disminuyó a medida que el periodo de almacenamiento se incrementó, por ello las que se almacenaron a 25 °C fueron las que presentaron mayor degradación, este comportamiento refleja una cinética de reacción de primer orden con coeficientes de correlación mayores a 0.86 (**Tabla 10**). Este tipo de cinética también ha sido observada por Arrazola *et al.* (2014b), Burin *et al.*, (2011), De Rosso y Mercadante (2007) y Souza *et al.* (2014).

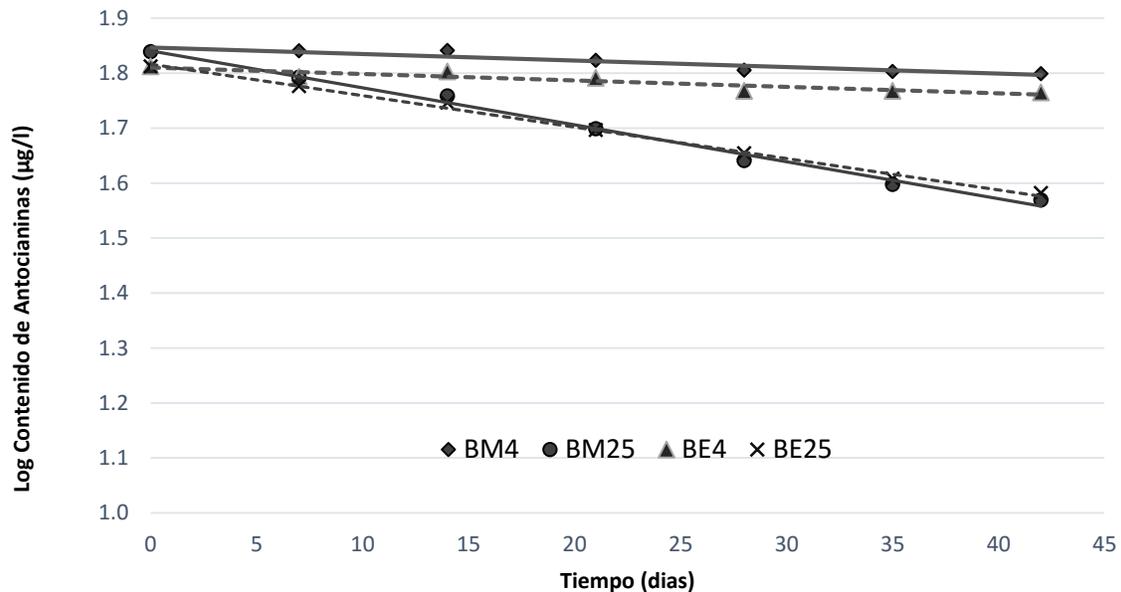


Figura 11. Cinética de degradación del extracto de antocianinas y antocianinas encapsuladas con Maltodextrina: Capsul (25:75) en una bebida isotónica sometida a 4 °C y 25 °C. BM4: bebida con microcápsulas a 4 °C; BM25: bebida con extracto microcápsulas a 25 °C; BE4: bebida con extracto a 4 °C; BE25: bebida con extracto a 25 °C

La constante de cinética de primer orden (k), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y la retención de antocianinas tuvieron un efecto altamente significativo ($p < 0.0001$) en relación a la temperatura, los resultados de la **Tabla 9** muestra que las bebidas almacenadas a 4 °C exhibieron mayores valores

de vida media, valor de k y mayor porcentaje de retención de antocianinas que a 25 °C. En general, estos resultados indican que ocurrió una mayor degradación de las antocianinas a 25 °C.

La estabilidad de las antocianinas es afectada por el pH, la temperatura de almacenamiento, estructura química, agua, luz, oxígeno, azúcares y presencia de enzimas. En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura en las antocianinas presentes en la bebida, existen reportes que mencionan que la degradación de las antocianinas en medio acuoso, se debe a la hidrólisis del enlace glucosídico produciendo monosacáridos y aglucona (Sharma *et al.*, 2016). La bebida evaluada tenía un pH de 2.5 y no vario a lo largo del periodo de almacenamiento, condición para que las antocianinas se mantengan estables (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando la temperatura incrementa, la degradación se puede llevar a cabo en varias etapas, primero ocurre una desglucosilación en la estructura de la antocianina, donde los productos resultantes son el monosacárido y la aglucona, en la última etapa ocurre una incisión de la aglucona y de esta se derivan un ácido fenólico y un aldehído fenólico que son los productos de la degradación (Sadilova *et al.*, 2006).

Tabla 10. Parámetros cinéticos de degradación de las antocianinas encapsuladas y no encapsuladas en una bebida isotónica almacenadas a 4 °C y 25 °C en ausencia de luz.

Tratamiento	$k \times 10^{-3}$ (horas ⁻¹)	$t_{1/2}$ (horas)	R ²	RA (%)
BM4	0.11 ^b	6019.5 ^a	0.8508 ^b	91.21 ± 0.28 ^a
BM25	0.69 ^a	1003.3 ^b	0.9917 ^a	53.72 ± 0.27 ^c
BE4	0.11 ^b	6019.5 ^a	0.8424 ^b	89.63 ± 0.22 ^a
BE25	0.53 ^a	1337.7 ^b	0.9926 ^a	58.83 ± 1.37 ^b

¹Media aritmética de tres repeticiones, letras iguales dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

BM4: bebida con microcápsulas (4°C); BM25: bebida con microcápsulas (25°C); BE4: bebida con extracto (4°C); BE25: bebida con extracto (25°C).

La disposición de las antocianinas (extracto y microencapsuladas) en la bebida mostró un efecto significativo ($p=0.0028$) sobre la retención de antocianinas y un efecto altamente significativo ($p<0.0001$) cuando interaccionan con la temperatura de almacenamiento. Es por ello que las bebidas almacenadas a 4 °C mostraron mayor estabilidad con 91.21% y 89.63% de retención de antocianinas en la bebida con microcápsulas y con extracto, respectivamente; y cuando las bebidas

estuvieron almacenadas a 25 °C la retención fue mayor en la de extracto (58.83%) y menor en la de microcápsulas (53.72%). Las antocianinas microencapsuladas muestran menor estabilidad que las del extracto cuando fueron almacenadas a 25 °C, esto puede deberse a que las antocianinas del extracto no sufrieron el efecto térmico del secado al que fueron sometidas las antocianinas de las microcápsulas. Arrazola *et al.*, (2014b) elaboraron una bebida isotónica con antocianinas extraídas de la cascara de berenjena y microencapsuladas con maltodextrina, evaluaron estas bebidas bajo las mismas condiciones de almacenamiento y obtuvo tiempo de vida media de 319.9 h para la bebida que contenía antocianinas microencapsuladas con maltodextrina y 200.2 h en la bebida con extracto de antocianinas, ambas almacenadas a 25 °C, estos resultados son mucho menores a los obtenidos en este estudio (1003.3 h y 1337.7 h, respectivamente), al igual que la retención de antocianinas, 12.5% para la bebida de microcápsulas y 3.66% para la bebida con extracto de antocianinas, mientras que en este estudio fueron de 53.7 y 58.8%, respectivamente. Los resultados indican que las antocianinas de chagalapoli son mucho más estables que las de la berenjena, la antocianina predominante en la berenjena es delfinidina-3-rutinosido, mientras que en el chagalapoli existen Malvidina 3-*O*-galactosido, Petunidina 3-*O*-arabinosido y Delfinidina 3-*O*-galactosido en mayor proporción. Según Von Elbe y Schwartz (1996), los alimentos que contienen agliconas de pelargonidina, cianidina, o delfinidina son menos estables que los alimentos que contienen agliconas de petunidina y malvidina, en el caso de chagalapoli predominan estas dos antocianinas.

4.3.1.1. Evaluación de sólidos solubles en la bebida

El contenido de sólidos solubles de las bebidas incrementó solo para las bebidas almacenadas a 25 °C (**Figura 12**), este efecto coincide a su vez con la degradación de las antocianinas tal como se observa en la **Figura 11**. En general, cuando incrementa el tiempo y la temperatura aumenta la cantidad de sólidos solubles y también la degradación de antocianinas, lo que puede indicar que el aumento de los sólidos solubles es el producto de la degradación de las antocianinas. De Rosso y Mercadante (2007) afirman que el incremento en los sólidos solubles está relacionado con la degradación de las antocianinas después de observar un efecto negativo de los azúcares y sales en la estabilidad de las antocianinas al evaluarlas en una bebida isotónica y sistemas buffer.

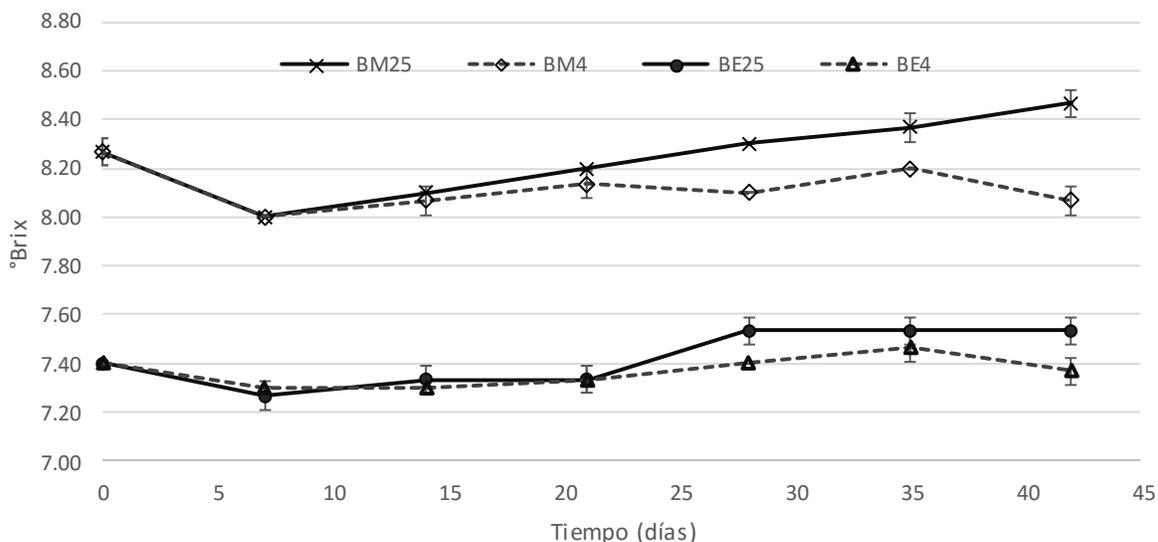


Figura 12. Contenido de sólidos en las bebidas isotónicas con antocianinas microencapsuladas (BM4 y BM25) y con extracto líquido (BE4 y BE25) almacenadas durante 42 días.

El incremento de los sólidos solubles puede deberse a dos razones, primero a una hidrólisis de los almidones que contiene el material de pared debido al pH ácido del sistema y la temperatura del almacenamiento, que se descomponen en monosacáridos (azúcares) como unidad mínima de los carbohidratos. Girones Villaplana *et al.* (2014) también observaron un incremento de sólidos solubles al evaluar durante 70 días una bebida isotónica con bayas liofilizadas, por su parte lo atribuyo a cambios hidrolíticos de los almidones presentes en la bebida que se descomponen en azúcares. Por otro lado, existe la posibilidad de que los azúcares que se liberan en la primera etapa de la degradación de las antocianinas, a través de la desglucosilación (Sharma *et al.*, 2016), se precipitan y por ello aumente la cantidad de sólidos suspendidos.

4.3.1.2 Estabilidad del color durante el almacenamiento

Los parámetros de color incluyen luminosidad (L^*), la tonalidad cromática (ángulo de tonalidad, hue), y cromaticidad o saturación de color (C^*) medidos en la escala CIELab. El parámetro L^* incremento en todos los tratamientos a lo largo del tiempo evaluado (**Tabla 11**), siendo las bebidas almacenadas a 25 °C las que mostraron mayor diferencia significativa ($p=0.05$) a 25 °C, esto indica una mayor degradación de color ($L^*=100$, blanco). Arrazola *et al.*, (2014b) también observaron un aumento en el valor L en las bebidas isotónicas elaboradas con antocianinas microencapsuladas con maltodextrina y almacenadas a 4 °C y 25 °C. Así mismo, Girones-Vilaplana *et al.* (2014)

observaron este comportamiento en bebidas isotónicas de bayas liofilizadas al evaluarlas durante 70 días y sugiere que la degradación de antocianinas está relacionado con el aumento de luminosidad.

En cuanto a C* y hue, estos se comportaron de la misma forma, es decir cuando los valores de C* incrementaron para las bebidas almacenadas a 4 °C durante los 42 días, hue también aumentó y cuando croma disminuyó para las bebidas a 25 °C, hue disminuyó (**Tabla 11**). Sin embargo, este comportamiento indica que hubo una degradación de color en las bebidas almacenadas a 25 °C, mientras que a 4 °C hubo una ligera intensificación de color. Las antocianinas poseen coloraciones rojizas que presentan ángulos de tonalidad desde 0° hasta 60°, las de matices cercanos o menores que 0° poseen coloraciones violeta y las cercanas a 60° tienen coloraciones anaranjadas (Santacruz-Cifuentes, 2011). C* representa la pureza del color (a valores más altos de C*, colores más vivos). Todos los parámetros de color (L*, C* y hue) tuvieron un efecto altamente significativo ($p < 0.0001$) para el tiempo y la temperatura. Este comportamiento ha sido observado en otras investigaciones (Arazola *et al.*, 2014b, Sari *et al.*, 2012).

Para determinar la relación entre el parámetro L*, C*, hue y el contenido total de antocianinas, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson. La cantidad de antocianinas totales se correlacionó fuertemente de forma negativa con L* ($r^2 = -0.94616$, $p < 0.0001$), lo que significa que a valores mayores de TAC corresponden valores menores de L*, esto quiere decir que las bebidas en el tiempo cero contenían la mayor cantidad de antocianinas al tener un color más intenso. Este comportamiento de las variables coincide con lo reportado por Gironés-Vilaplana *et al.* (2013) cuando evaluaron el contenido de antocianinas de diferentes bebidas isotónicas elaboradas con frutos de bayas liofilizadas (acaí, endrino y maqui).

Tabla 11. Estabilidad de los valores L*, C* y hue de las bebidas isotónicas durante su almacenamiento.

Tratamiento y Parámetro CIE	Día						
	0	7	14	21	28	35	42
BE4							
L*	26.76 ^c	27.19 ^{bc}	27.02 ^c	27.33 ^{bc}	28.02 ^a	27.3 ^{bc}	27.66 ^{ab}
C*	59.83 ^b	60.98 ^{ab}	61.24 ^a	61.36 ^a	61.56 ^a	61.73 ^a	61.47 ^a
hue	37.30 ^b	37.90 ^{ab}	38.16 ^{ab}	37.97 ^{ab}	38.07 ^{ab}	38.42 ^a	38.34 ^{ab}
BE25							
L*	26.76 ^d	28.39 ^c	29.18 ^{bc}	30.17 ^{ab}	30.05 ^{ab}	30.45 ^{ab}	31.02 ^a
C*	59.83 ^{ab}	60.84 ^a	60.16 ^a	58.46 ^{bc}	58.44 ^{bc}	56.89 ^{dc}	55.46 ^d
hue	37.30 ^a	37.57 ^a	36.66 ^{ab}	34.56 ^{bc}	34.75 ^{bc}	33.02 ^{dc}	31.84 ^d
BM4							
L*	25.36 ^c	25.15 ^c	25.58 ^{bc}	25.43 ^c	26.46 ^a	26.05 ^{ab}	26.23 ^a
C*	57.39 ^c	60.58 ^a	58.82 ^b	60.3 ^a	61.19 ^a	61.03 ^a	60.64 ^a
hue	36.53 ^c	38.40 ^a	37.28 ^{bc}	37.96 ^{ab}	38.55 ^a	38.45 ^a	38.25 ^a
BM25							
L*	25.36 ^e	27.14 ^d	27.91 ^{dc}	28.45 ^{bc}	28.81 ^{bc}	29.39 ^{ab}	29.99 ^a
C*	57.39 ^c	60.22 ^a	59.04 ^{ab}	58.2 ^{bc}	56.96 ^c	55.16 ^d	53.06 ^e
hue	36.53 ^a	37.71 ^a	36.38 ^{ab}	35.10 ^{bc}	33.92 ^c	31.84 ^d	30.52 ^d

¹Media aritmética de tres repeticiones, letras iguales dentro de la misma fila, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$). BE4: bebida con extracto de antocianinas (4°C), BE25: bebida con extracto de antocianinas (25°C), BM4: bebida con antocianinas microencapsuladas (4°C), BM25: bebida con antocianinas microencapsuladas (25°C).

La diferencia entre los colores puede ser descrita por la distancia total entre dos colores en las tres dimensiones del espacio de color CIELab (Obon *et al.*, 2009). En las bebidas evaluadas, la diferencia de color se debió principalmente al efecto significativo ($p < 0.0001$) de la temperatura, es por ello que las bebidas almacenadas a 25 °C mostraron una mayor diferencia de color en comparación con las que se almacenaron a 4 °C (**Figura 13**), al finalizar el periodo de almacenamiento. La bebida con microcápsulas a 25 °C tuvo una ΔE de 8.58 y la de extracto 8.21. Una diferencia en el color de 0 a 1.5 puede considerarse pequeña y casi idéntica para la observación visual, en el intervalo de 1.5 a 5 la diferencia de color puede ser distinguida, mientras que la diferencia de color puede ser evidente para ΔE superior a 5 (Obon *et al.*, 2009). Por lo tanto, el pigmento microencapsulado podría aplicarse en bebidas siempre y cuando estas se mantengan

almacenadas a 4 °C, teniendo en cuenta que el color se conservara hasta el momento de consumirse la bebida.

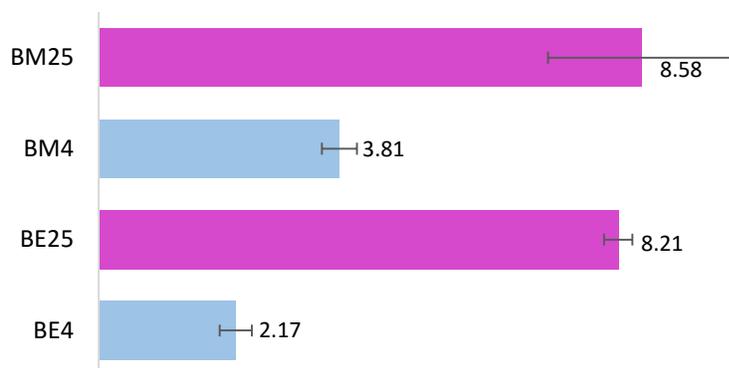


Figura 13. Diferencia de color en las bebidas a los 42 días de almacenamiento. Bebida con microcápsulas a 4 °C (BM4) y a 25 °C (BM25); bebida con extracto a 4 °C (BE4) y a 25 °C (BE25).

4.3.2 Perfil de antocianinas en la bebida por HPLC

Se detectaron 12 antocianinas en las microcápsulas de las antocianinas (**Figura 14**) y corresponden a las que identificó Joaquín-Cruz *et al.* (2015) en el extracto del fruto fresco de chagalapoli y estas mismas antocianinas fueron detectadas en las bebidas (**Figura 15**).

En el cromatograma de la **Figura 15** se observa la degradación de las antocianinas presentes en las bebidas al día cero y a los 42 días de almacenamiento a 4 y 25 °C. El cromatograma de la **Figura 15-(A)** que corresponde a la bebida elaborada con microcápsulas, indica que hubo mayor degradación de las antocianinas con respecto a la bebida elaborada con extracto de la **Figura 15-(B)**, pues los picos son de menor magnitud. Estos resultados también se ven reflejados en las antocianinas totales y en cada una de las antocianinas cuantificadas de la **Tabla 12**.

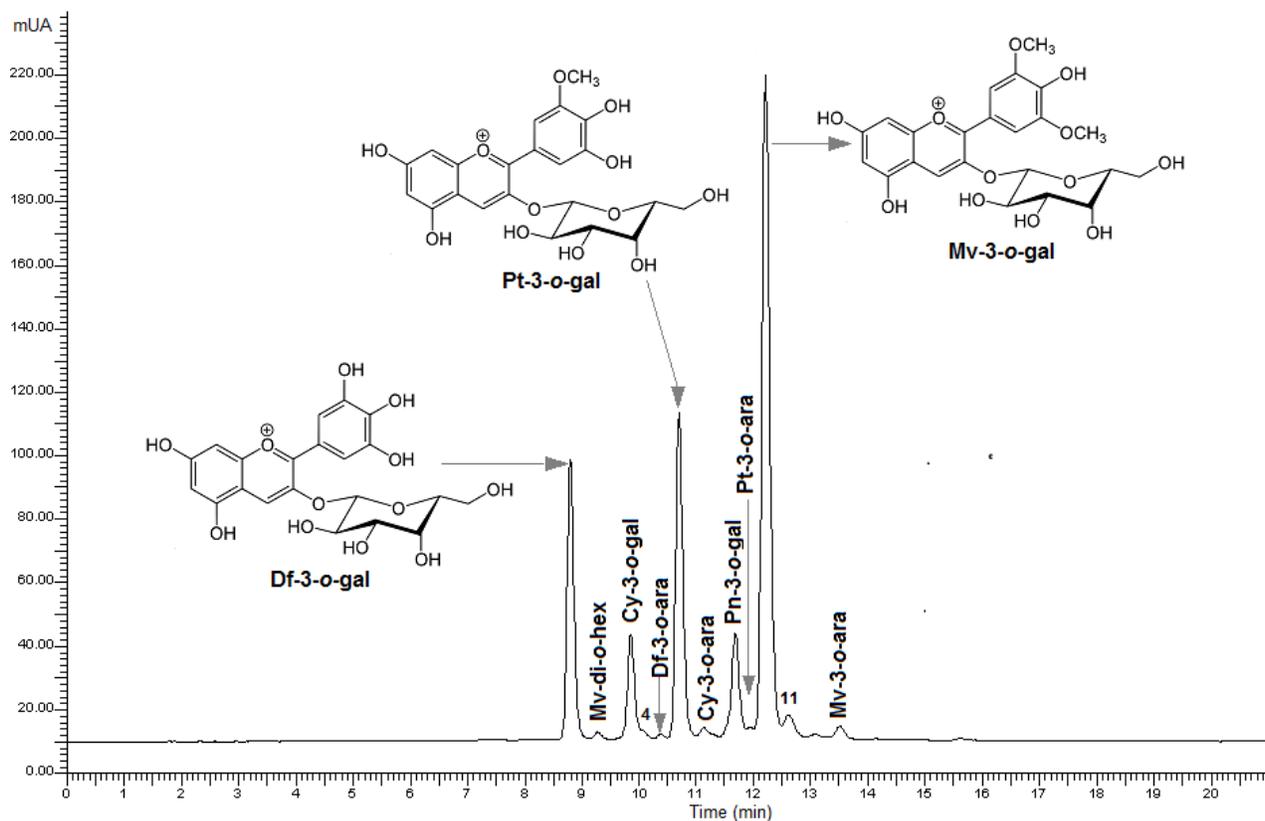


Figura 14. Cromatograma de microcápsulas de antocianinas de chagalapoli obtenido por HPLC e identificación de antocianinas.

La retención de antocianinas en la bebida elaborada con microcapsulas a 4 °C y 25 °C después de 42 días de almacenamiento fue de 8.94% y 46.41%, respectivamente (**Tabla 12**). La bebida elaborada con extracto bajo las mismas condiciones de almacenamiento mostró 10.35% y 40.94% de retención de antocianinas, respectivamente. En general, las bebidas almacenadas a 25 °C fueron las que presentaron menor estabilidad al obtener menor porcentaje de retención de antocianinas. Cianidina 3-O-galactosido fue la antocianina que mostro mayor estabilidad en la bebida durante el almacenamiento, en la **Tabla 12** se percibe que presento el mayor porcentaje de retención a 25 °C, 59.87% en la bebida de extracto y 45.07% en la bebida con microcápsulas.

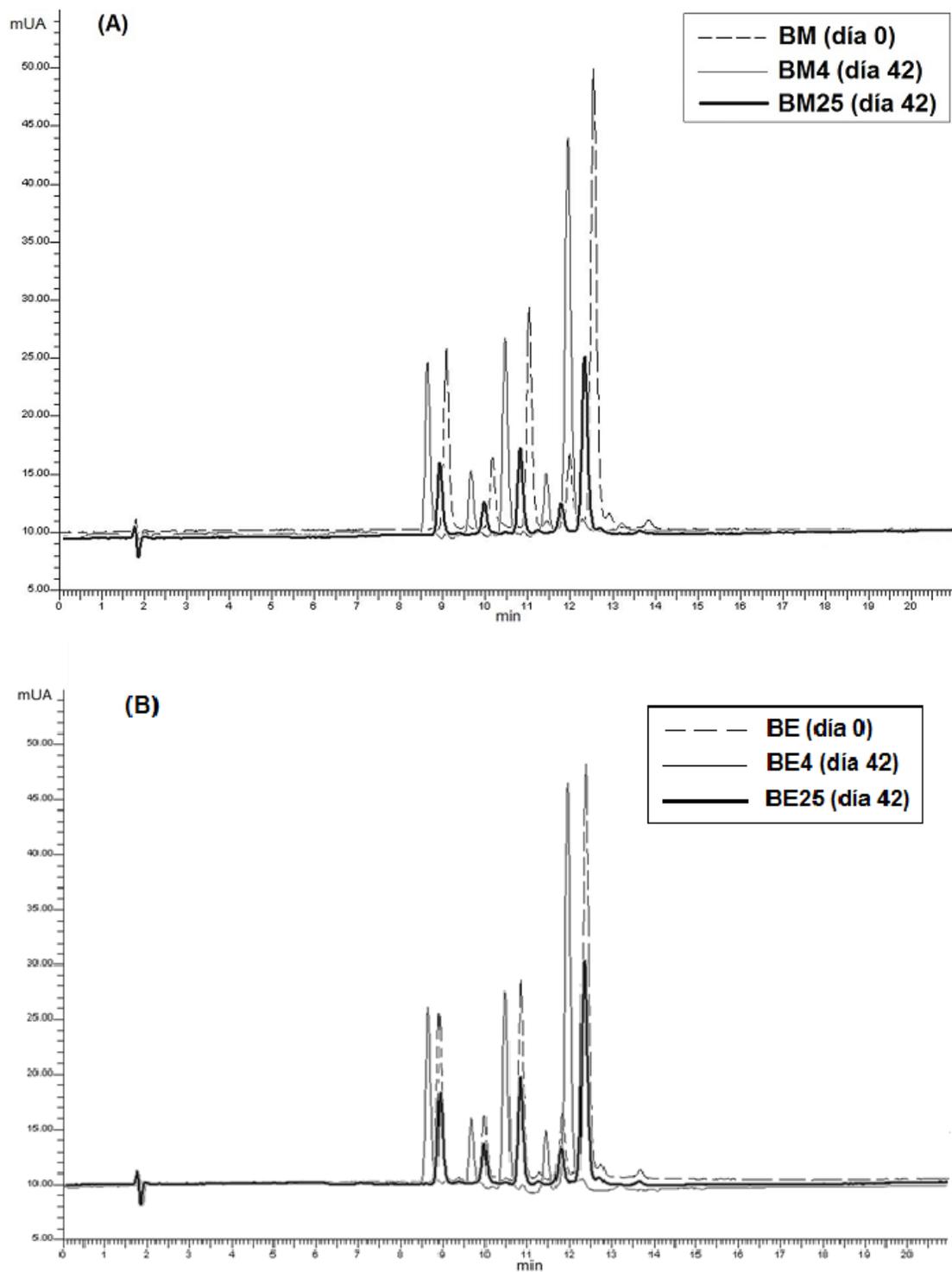


Figura 15. Cromatogramas de la bebida con antocianinas microencapsuladas (A) y bebida con extracto de antocianinas (B) que muestran el perfil de las antocianinas en el día 0 y después de 42 días a 4 y 25 °C.

Tabla 12. Contenido de antocianinas presentes en las bebidas al inicio y al final del periodo de almacenamiento, determinado por HPLC y antocianinas totales por espectrofotometría.

Bebida	Tiempo (días)	Delf-3-O-Gal (µg/mL)	Cian-3-O-gal (µg/mL)	Pet-3-O-gal (µg/mL)	Peo-3-O-gal (µg/mL)	Malv-3-O-gal (µg/mL)	AA Totales (µg/mL)
BE	0	9.98±0.03 ^b	4.17±0.13 ^a	12.49±0.13 ^a	4.57±0.14 ^a	29.47±0.35 ^{ab}	65.26±0.17 ^b
BE4	42	10.83±0.06 ^a	5.02±1.00 ^a	13.00±0.44 ^a	4.21±0.57 ^a	29.07±0.41 ^b	58.50±0.36 ^d (89.64)
BE25	42	5.21±0.10 ^c (52.17)	2.49±0.09 ^b (59.87)	6.59±0.18 ^b (52.77)	2.49±0.19 ^b (54.63)	15.64±0.18 ^c (53.09)	38.54±0.20 ^e (58.56)
BM	0	10.26±0.09 ^b	4.43±0.11 ^a	13.07±0.18 ^a	4.95±0.04 ^a	30.82±0.02 ^a	69.29±0.04 ^a
BM4	42	10.95±0.16 ^a	4.30±0.10 ^a	12.95±0.12 ^a	4.66±0.25 ^a	30.17±0.54 ^{ab}	63.09±0.10 ^c (91.25)
BM25	42	4.36±0.15 ^d (42.54)	1.99±0.12 ^b (45.07)	5.34±0.22 ^c (40.90)	1.92±0.45 ^b (38.83)	12.36±0.74 ^d (40.10)	37.12±0.11 ^f (53.75)

AA: antocianinas; BE-D0: bebida con extracto (día 0); BE4-D42: bebida con extracto a 4°C (día 42); BE25-D42: bebida con extracto a 25°C (día 42); BM-D0: bebida con microcápsulas (día 0); BM4-D42: bebida con microcápsulas a 4°C (día 42); BM25-D42: bebida con microcápsulas a 25°C (día 42).

¹Media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de retención de la antocianina a los 42 días de almacenamiento.

4.4 CONCLUSIONES

La estabilidad del color y las antocianinas en la bebida fue afectada por la temperatura, de esta manera las bebidas almacenadas a 4 °C (con extracto líquido y con microcápsulas) presentaron el mejor tiempo de vida media, retención de antocianinas y mostraron imperceptibles cambios de color que la hacen aceptable para los consumidores.

La encapsulación no brinda mayor estabilidad a las antocianinas del chagalapoli al ser utilizadas como pigmento en una bebida isotónica, sin embargo es necesario evaluarlas en otras matrices de alimentos ya que estas antocianinas muestran una muy buena estabilidad al ser incorporadas en la bebida como extracto líquido, haciéndolas atractivas como pigmento natural para la industria de alimentos, y que además brindan efectos beneficiosos en la salud.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CINVESTAV Querétaro por el apoyo brindado para realizar la microencapsulación en esta investigación.

REFERENCIAS

- Arrazola, G., Herazo, I. & Alvis, A. 2014. Obtención y Evaluación de la Estabilidad de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en Bebidas. *Información tecnológica*, 25, 43-52.
- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C. R. & Boirdignon-Luiz, M. T. 2011. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 186-193. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02486.x
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. D., Paez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A. & Galan-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- De Rosso, V. V. & Mercadante, A. Z. 2007. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 347-352. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.03.008
- Ersus, S. & Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009
- Falcao, L. D., Falcao, A. P. & Gris, E. F. 2008. Spectrophotometric study of the stability of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape skins in a model system. *Brazilian Journal of Food Technology*. 11, 63-69.

- Fossen, T., Slimestad, R. & M., A. O. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarigrass (*Phalaris arundinacea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2318-2321. DOI: 10.1021/jf001399d
- Galaffu, N., K. Bortlik, M. Michel. 2015. 5-An industry perspective on natural food colour stability. In: *Colour Additives for Foods and Beverages*, page 91–130
- Garcia-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y. & Martinez-Bustos, F. 2015. Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 717-726. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.10.003
- Girones-Vilaplana, A., Mena, P., Moreno, D. A. & Garcia-Viguera, C. 2014. Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 1090-1100. DOI: 10.1002/jsfa.6370
- Girones-Vilaplana, A., Villano, D., Moreno, D. A. & Garcia-Viguera, C. 2013. New isotonic drinks with antioxidant and biological capacities from berries (maqui, acai and blackthorn) and lemon juice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 897-906. DOI: 10.3109/09637486.2013.809406
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.* 14, 217–225. DOI: 10.1016/s1369-703x(02)00221-8
- Gras, C. C., Carle, R. & Schweiggert, R. M. 2015. Determination of anthocyanins from black carrots by UHPL-PDA after ultrasound-assisted. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 170-177. DOI: 10.1016/j.jfca.2015.08.011
- Idham, Z., Muhamad, I. I. & Sarmidi, M. R. 2012. Degradation Kinetics And Color Stability Of Spray-Dried Encapsulated Anthocyanins From Hibiscus Sabdariffa L. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 522-542. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2010.00605.x
- Joaquin-Cruz, E., Duenas, M., Garcia-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C. & Garcia-Salinas, C. 2015. Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151-157. DOI: 0.1016/j.foodres.2015.01.033
- Obon, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M. & Fernandez-Lopez, J. A. 2009. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90, 471-479. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.07.013
- Sadilova, E., Stintzing, F. C. & Carle, R. 2006. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71, C504-C512. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00148.x
- Salinas, M. Y., Sanchez, G. S., Hernandez, D. R. & Lobato, N. R. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*, 43, 483-487.
- Santacruz-Cifuentes, L. A. 2011. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de maestría en ciencias químicas, Universidad nacional de Colombia.

- Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D. & Supratman, U. 2012. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*, 132, 1908-1914. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.12.025
- Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K. & Singh, I. P. 2016. Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry*, 190. 808-817.
- Shipp, J. & Abdel-Aal, E.-S. M. 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4. 7-22.
- Todaro, A., F. Cimino, P. Rapisarda, A. E. Catalano, R.N. Barbagallo, G. Spagna. 2009. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114, 434-439. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.102
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpeoleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Researc. International*. 43, 907-914. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.12.013
- Von Elbe M., Shwartz R., Colorants. 1996, *in*: Food Chemistry (ed. O.R. Fennema). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 681-694.
- Xu, J., Su, X., Lim, S., Griffin, J., Carey, E., Katz, B., Tomich, J., Smith, J. S. & Wang, W. 2015. Characterisation and stability of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato P40. *Food Chemistry*, 186, 90-96. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.123

CAPÍTULO V. ESTABILIDAD DE LOS POLVOS EN EL ALMACENAMIENTO

5.1 INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son pigmentos naturales, que se encuentra en las frutas y pueden ser utilizadas en los alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. Proporcionan colores que pueden variar desde el naranja, rojo, violeta y azul, mostrando un gran potencial como colorantes naturales, debido a su baja toxicidad (Tonon *et al.*, 2010).

Sin embargo, las antocianinas son muy inestables durante la transformación y su almacenamiento, ya que son sensibles a factores como la temperatura, la luz, pH, oxígeno y otros. Varias estudios se han enfocado a evaluar la estabilidad de antocianinas frente a estos factores, en productos como extractos de zanahoria negra (Ersus y Yurdagel, 2007) y extractos de cálices jamaica (Idham *et al.*, 2012) secados por aspersión, jugo de zanahoria negra (Kirca *et al.*, 2007). La degradación de antocianinas por lo general sigue una cinética de primer orden, es decir, el contenido de antocianina disminuye exponencialmente con el tiempo (Tonon *et al.*, 2010).

El secado por aspersión es una tecnología alternativa para la producción de pigmentos de antocianina. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la microencapsulación de ingredientes alimentarios susceptibles al deterioro por agentes externos y consiste en atrapar un agente activo en una matriz polimérica, con el fin de protegerlo de condiciones adversas. La microencapsulación ha sido utilizada por la industria alimentaria con el fin de proteger ingredientes de alimentos sensibles durante el almacenamiento, así como para proteger a los alimentos contra las pérdidas nutricionales (Re, 1998).

En el presente estudio, se evaluó la estabilidad de las antocianinas de las antocianinas de chagalapoli microencapsuladas con maltodextrinas y Capsul, bajo condiciones aceleradas durante 10 semanas, almacenadas a una temperatura de 35 °C y en ausencia de luz.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Estudio de estabilidad de los polvos en el almacenamiento

La estabilidad de las antocianinas en los polvos fue determinada a través de un estudio de vida útil acelerada recomendada por Labuza y Schmidl (1985). Los polvos de pigmento se almacenaron en viales de plástico, se cubrieron con papel aluminio para evitar el contacto con la luz y se

almacenaron en una estufa a 35° C durante un periodo 10 semanas para determinar la degradación de las antocianinas. El contenido total de antocianinas en los polvos fue cuantificado cada semana para obtener la cinética de degradación.

Siguiendo la metodología descrita por Burin *et al.*, (2011), se graficó el logaritmo del contenido de antocianinas totales en función del tiempo para cada tratamiento y la constante cinética de primer orden (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las antocianinas en las micropartículas se calcularon usando las **ecuaciones 4 y 5** indicadas en el capítulo IV, respectivamente.

5.2.2 Contenido de antocianinas totales en polvos

Se utilizó la metodología empleada por García-Tejeda *et al.*, (2015) con algunas modificaciones. 200 mg del pigmento encapsulado se disolvieron con 4 mL de metanol: ácido acético: agua (10:1:9), se agitó la suspensión durante 1 min en vortex y se sónico durante 20 min en un baño ultrasonicador. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min y después fueron decantadas. Este procedimiento se realizó dos veces. El contenido de antocianinas totales fue cuantificado de acuerdo a la metodología empleada por Salinas *et al.* (2005), utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda 2S UV-VIS) a 530 nm y 700 nm. TAC se calculó con una curva de calibración de malvidina-3-galactosido (**Anexo A4**). Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de longitud.

5.2.3 Cambios de color en el almacenamiento

El color de los polvos fue medido al inicio y al final del almacenamiento con un colorímetro HunterLab® (Modelo MiniScan, Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia, EE.UU.). El color se obtuvo en términos de L* (luminosidad), a* y b* y a partir de estos se realizó la conversión a nanómetros.

5.2.4 Perfil de Antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se determinó el perfil de antocianinas en las muestras al inicio y al final del estudio para observar la degradación de las antocianinas durante el almacenamiento. La extracción de las antocianinas se realizó conforme a la metodología descrita en el **apartado 5.2.2**. La metodología para realizar el análisis por HPLC es la misma que se describe en el **apartado 3.2.3**.

5.2.5 Análisis estadístico

Los experimentos de almacenamiento se realizaron por triplicado para cada temperatura. El grado de importancia entre las diversas constantes se analizaron mediante análisis de varianza de $p < 0,05$ mediante el software SAS. Se utilizó el análisis de regresión lineal para obtener las constantes de velocidad de degradación de las antocianinas. Los datos de regresión se calcularon mediante el uso de análisis de datos en Microsoft Excel 2007.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Estabilidad de los polvos en el almacenamiento

La estabilidad de las antocianinas microencapsuladas fue evaluada bajo condiciones de almacenamiento de 35°C en ausencia de luz durante un periodo de 10 semanas, en la **Figura 16** se observa que el contenido de antocianinas en todos los tratamientos de estudio disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento. Este comportamiento implica una cinética de degradación de primer orden en todos los tratamientos evaluados, que se evidencia por la relación lineal entre el total de la concentración de antocianinas versus tiempo graficado en la **Figura 16**. Respuestas de cinéticas similares en la degradación de antocianinas microencapsuladas han sido reportadas por Burin *et al.*, (2011), Idham *et al.*, (2012) y Ferrari *et al.*, (2013).

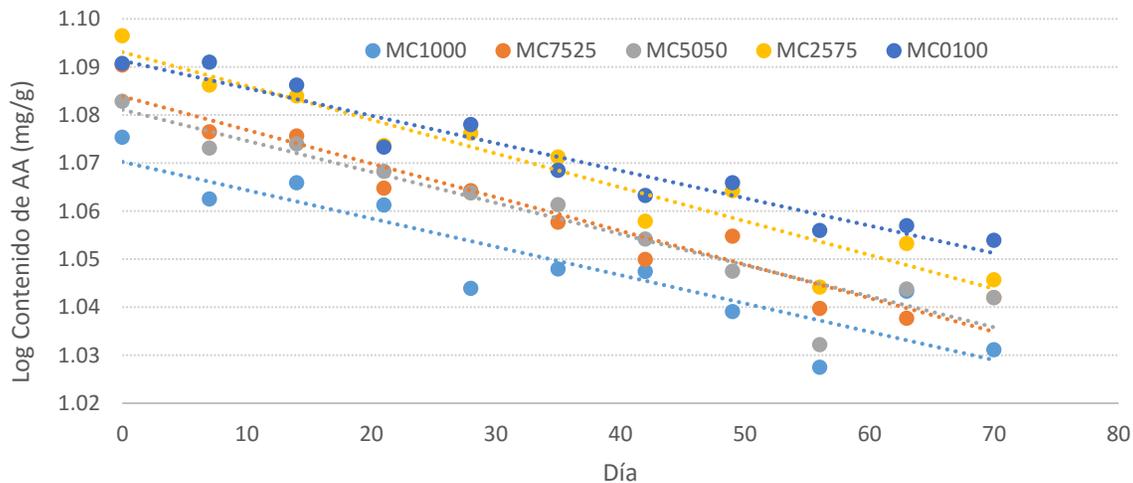


Figura 16. Degradación cinética de las antocianinas encapsuladas en almacenamiento a 35°C en ausencia de luz. Tratamientos MC1000: 100% Maltodextrina, MC7525: 75% maltodextrina-25% Capsul, MC5050: 50% maltodextrina-50% Capsul, MC2575: 25% maltodextrina-75% Capsul.

La **Tabla 13** presenta una relación de la pérdida de antocianinas durante el tiempo de almacenamiento, así como la constante de cinética de primer orden (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y el porcentaje de retención de las antocianinas (RA) encapsuladas en todos los tratamientos. El análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre las variables evaluadas en cada uno de los tratamientos, lo que indica que todos los tratamientos poseen estabilidad similar bajo las condiciones evaluadas. Estos resultados indican que Capsul y maltodextrinas confieren buena protección a las antocianinas encapsuladas cuando estas se almacenan a 35°C en ausencia de oxígeno y luz.

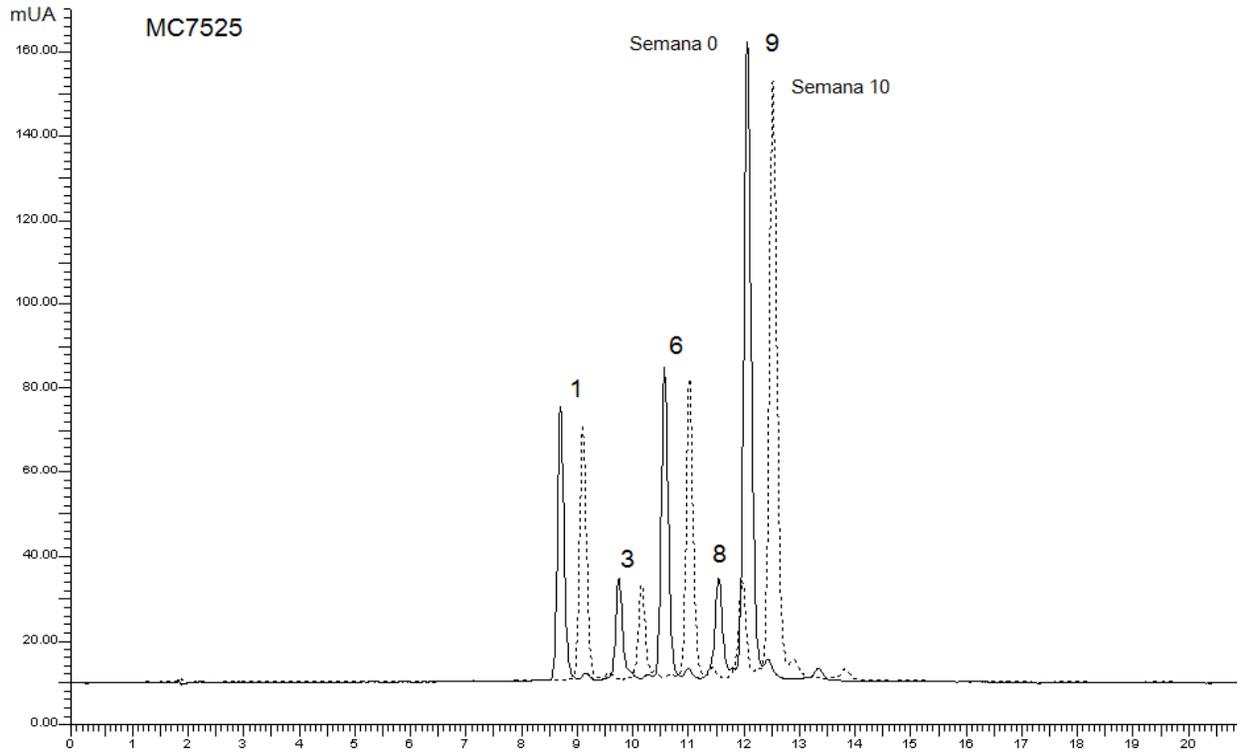
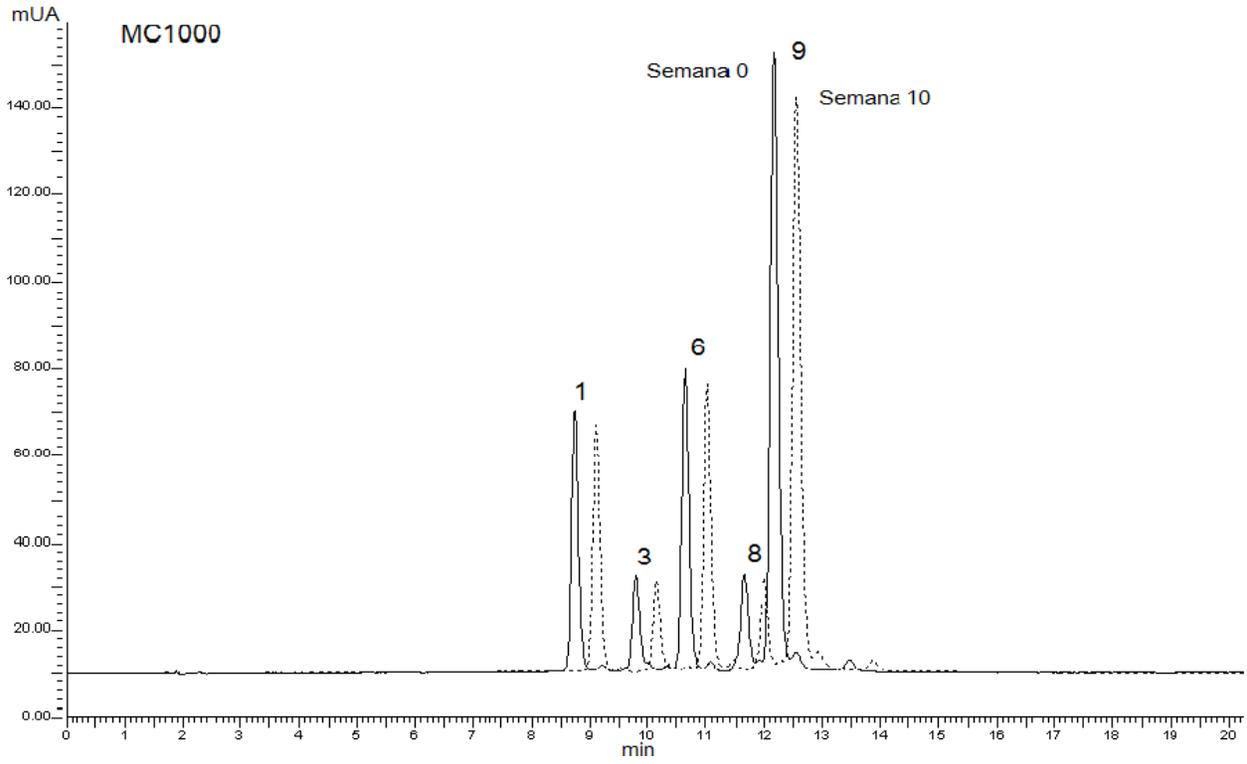
Tabla 13. Parámetros cinéticos de degradación de las antocianinas encapsuladas almacenadas a 35°C en ausencia de luz durante 10 semanas.

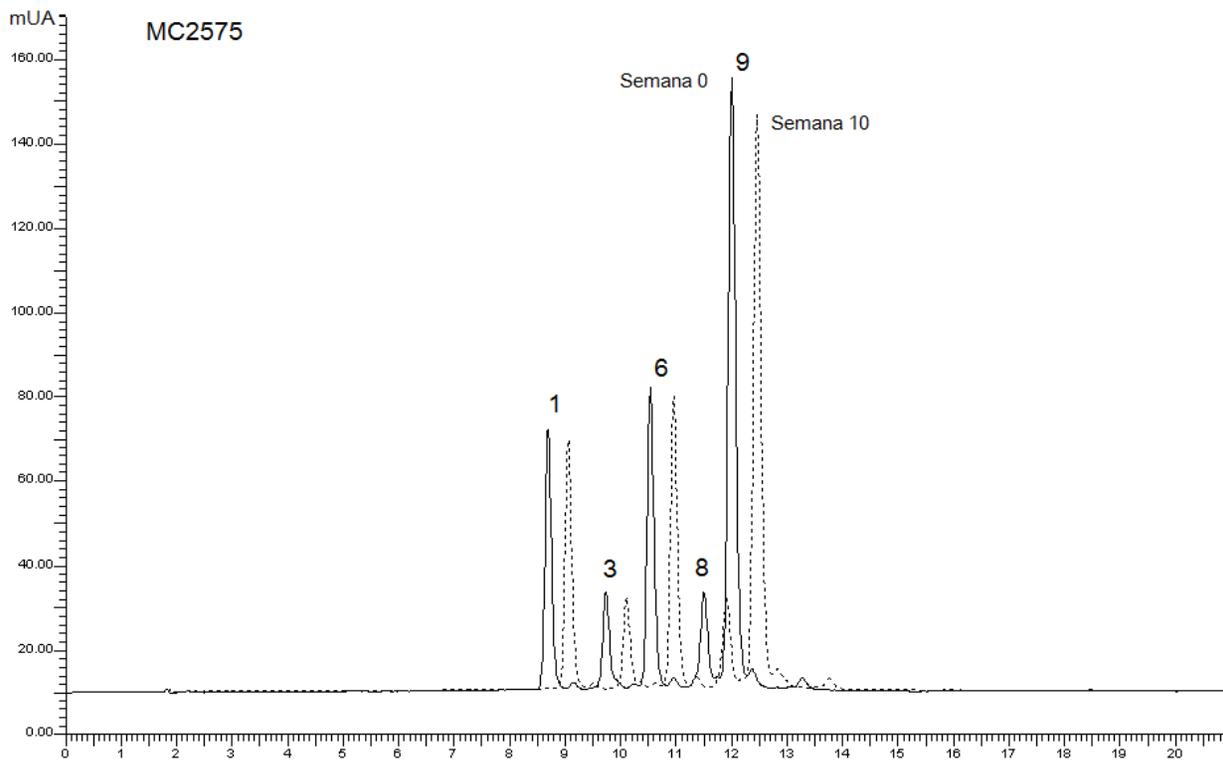
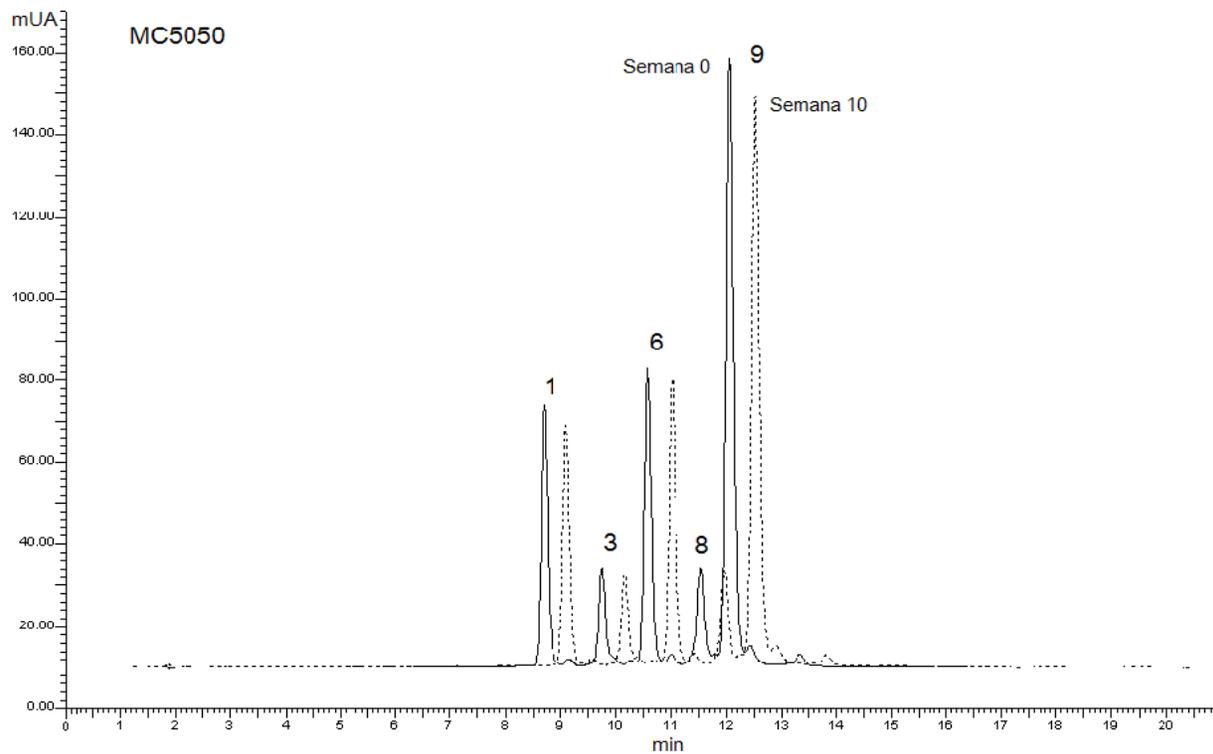
Tratamiento	$k \times 10^{-3}$ (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	R^2	RA (%)
MC1000	1.30 ± 0.13 ^a	535.0 ± 57.9 ^a	0.8283 ± 0.06 ^a	90.31 ± 1.35 ^a
MC7525	1.61 ± 0.00 ^a	429.9 ± 0.00 ^a	0.8882 ± 0.05 ^a	89.48 ± 2.04 ^a
MC5050	1.38 ± 0.00 ^a	501.6 ± 0.00 ^a	0.8547 ± 0.08 ^a	91.01 ± 0.77 ^a
MC2575	1.61 ± 0.23 ^a	435.9 ± 62.9 ^a	0.8756 ± 0.08 ^a	88.96 ± 1.24 ^a
MC0100	1.30 ± 0.13 ^a	535.1 ± 57.9 ^a	0.8817 ± 0.05 ^a	90.84 ± 1.21 ^a

^aMedia aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

5.3.2 Perfil de Antocianinas por HPLC

Todos los tratamientos mostraron el mismo perfil de antocianinas antes y después del almacenamiento, solo cambio la concentración de cada una de ellas, tal como se observa en la **Figura 17**. Las antocianinas identificadas son las mismas que se detectaron en el extracto (**Figura 9**) antes de ser secado.





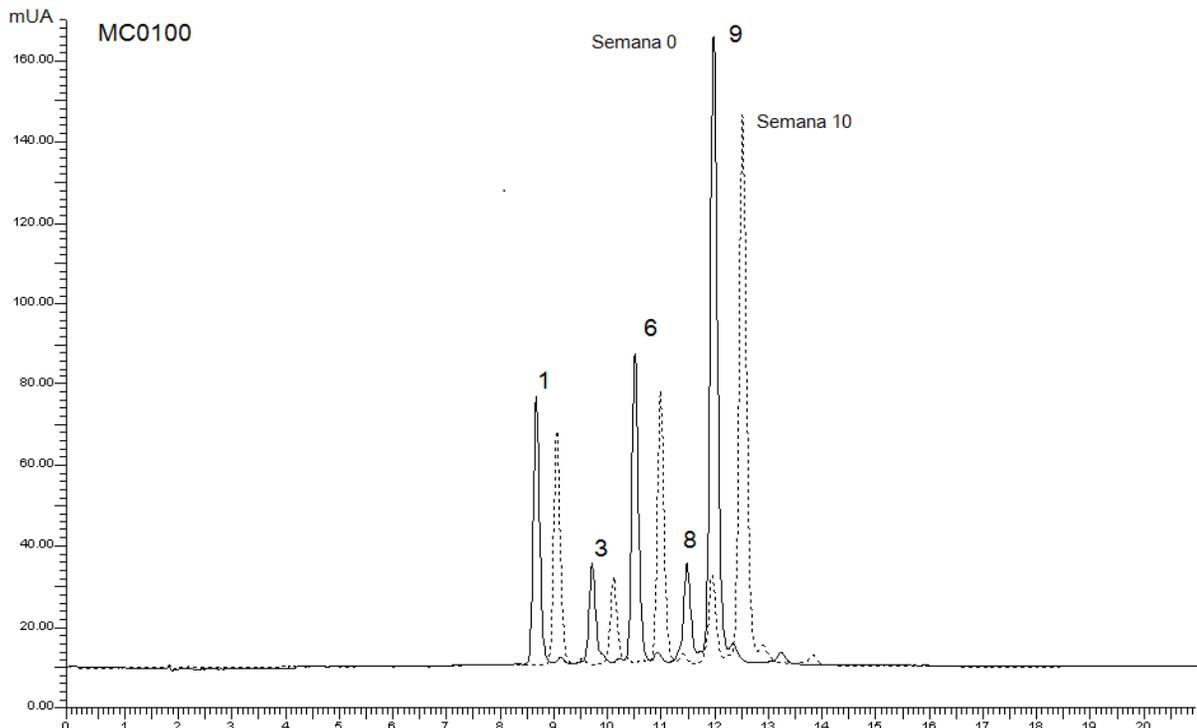


Figura 17. Cromatogramas de microcápsulas de antocianinas evaluadas en la semana 0 y semana 10 de almacenamiento.

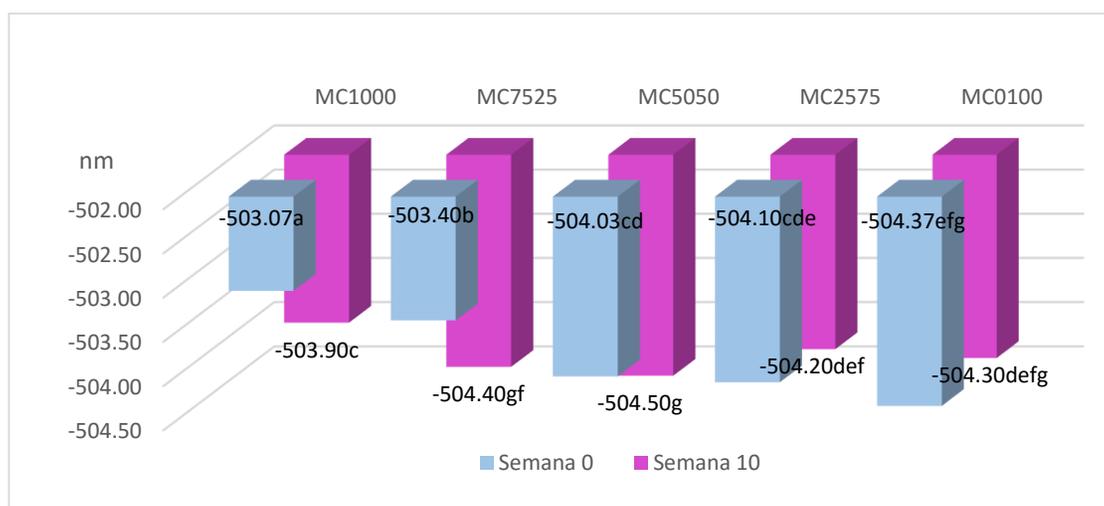
Las antocianinas que mostraron menor degradación de acuerdo a lo que se observa en la **Figura 17** y lo que se indica en la **Tabla 14** fueron delphinidina-3-O-galactosido (pico 1), cianidina-3-O-galactosido (pico 3), petunidina-3-O-galactoside (pico 6) y peonidina 3-O-galactosido (pico 8) en todos los tratamientos. Cianidina ha sido reportada como las más estables en el camote morado (Xu *et al.*, 2015). En cuanto a la petunidina, Sharma *et al.*, (2016) reportaron mayor estabilidad térmica de la petunidina-3,5-diglucosido ($t_{1/2}=132.94$ min) sobre malvidina-3,5-diglucosido, peonidina-3,5-diglucosido, delphinidina-3,5-diglucosido, cianidina-3,5-diglucosido con tiempos de vida media de 75.10, 68.49, 64.33 y 50.10 min, respectivamente.

Tabla 14. Contenido de antocianinas en las microcápsulas determinadas por HPLC de los diferentes tratamientos almacenados durante 10 semanas a 35°C en ausencia de luz.

Tratamiento	Tiempo almacenamiento	Df-3-gal	Cy-3-gal	Pt-3-gal	Pn-3-gal	Mv-3-gal
		mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
MC1000	Día 0	1.60	0.67	1.97	0.71	4.49
	Semana 10	1.56	0.64	1.90	0.70	4.25
MC7525	Día 0	1.68	0.82	2.13	0.85	4.67
	Semana 10	1.62	0.66	1.99	0.74	4.49
MC5050	Día 0	1.59	0.67	1.97	0.73	4.44
	Semana 10	1.59	0.63	1.92	0.71	4.30
MC2575	Día 0	1.60	0.66	1.96	0.71	4.40
	Semana 10	1.55	0.64	1.89	0.70	4.36
MC0100	Día 0	1.69	0.72	2.09	0.79	4.75
	Semana 10	1.56	0.65	1.91	0.72	4.30

5.3.3 Estabilidad de color durante el almacenamiento de las microcápsulas

El color de las micropartículas no cambio visualmente durante el almacenamiento, sin embargo estadísticamente si se observa una diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en los tratamientos MC1000, MC7525 y MC5050, mientras que los tratamientos MC2575 y MC0100 no presentaron diferencia significativa (**Figura 18**). En general, el comportamiento que mostraron fue que mientras menor proporción de Capsul contenían los tratamientos, mayor diferencia de color generaron.



Letras iguales dentro del mismo tratamiento, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Figura 18. Color expresado en nanómetros de las micropartículas al inicio y final del periodo de almacenamiento bajo condiciones de ausencia de luz y 35°C.

5.4 CONCLUSIONES

Capsul es el material de pared que brindó mejor protección a las antocianinas y que presentó el mayor tiempo de vida media (535 días) y mejor retención de antocianinas (90.84%) bajo condiciones de ausencia de luz y a 35°C. Los resultados obtenidos confirman que Capsul puede ser utilizado como material de pared para la encapsulación de antocianina.

5.5 REFERENCIAS

- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C. R. & Boirdignon-Luiz, M. T. 2011. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 186-193.
- Ersus, S. & Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812.
- Ferrari, C. C., Marconi Germer, S. P., Alvim, I. D. & De Aguirre, J. M. 2013. Storage Stability of Spray-Dried Blackberry Powder Produced with Maltodextrin or Gum Arabic. *Drying Technology*, 31, 470-478.
- García-Tejeda, Y. V., Salinas-Moreno, Y. & Martínez-Bustos, F. 2015. Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food and Bioprocess Technology*, 94, 717-726.
- Idham, Z., Muhamad, I. I. & Sarmidi, M. R. 2012. Degradation Kinetics And Color Stability Of Spray-Dried Encapsulated Anthocyanins From Hibiscus Sabdariffa L. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 522-542.
- Kirca, A., Özkan, M., & Cemeroglu, B. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101(1), 212–218.
- Labuza, T. P. & Schmidl, M. K. 1985. Accelerated shelf-life testing of foods. *Food Technology*, 39(9), 57-62.
- Re, M. I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 1195-1236.
- Salinas, M. Y., Sanchez, G. S., Hernandez, D. R. & Lobato, N. R. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*, 43, 483-487.
- Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K. & Singh, I. P. 2016. Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry*.
- Tonon, R. V., Brabet, C. & 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, 907-914.

Xu, J., Su, X., Lim, S., Griffin, J., Carey, E., Katz, B., Tomich, J., Smith, J. S. & Wang, W. 2015. Characterisation and stability of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato P40. *Food Chemistry*, 186, 90-96.

CONCLUSIONES GENERALES

Las antocianinas del chagalapoli pueden ser extraídas de forma eficiente utilizando etanol al 63.5%, un pH de 2 y un tiempo de sonicado de 30 min, con una relación pulpa de fruto:solvente de 1:5 (peso/volumen). Bajo estas condiciones la recuperación de antocianinas fue de 1545.45 ± 16.34 mg equivalentes de Mv3gal/100 g de tejido fresco.

La microencapsulación resulta ser una técnica adecuada para brindar mayor estabilidad durante el almacenamiento a las antocianinas del fruto chagalapoli, utilizando como material de pared una mezcla de Capsul:maltodextrina (50:50 p/p).

Capsul puede ser utilizado para la encapsulación de antocianinas a través del secado por aspersión, ya que proporciona alta eficiencia de encapsulación (>95) y buena protección a las antocianinas para su conservación al generar microcápsulas con baja humedad, baja actividad de agua, y baja higroscopicidad.

Las antocianinas del chagalapoli muestran ser muy estables debido a la presencia de Cianidina-3-galacosido, Petunidina-3-galactosido y Malvidina-3-O-galactosido.

La encapsulación no brinda mayor estabilidad a las antocianinas del chagalapoli al ser utilizadas como pigmento en una bebida isotónica, sin embargo es necesario evaluarlas en otras matrices de alimentos debido a que estas antocianinas muestran una muy buena estabilidad al ser incorporadas en la bebida como extracto líquido, haciéndolas atractivas como pigmento natural para la industria de alimentos, y que además brindan efectos benéficos en la salud.

ANEXOS

A1 .Solubilidad de las microcápsulas

Dentro de la caracterización de las microcápsulas se evaluó la solubilidad de las microcápsulas, sin embargo no se contempló para el artículo de “Optimización de la extracción de antocianinas de chagalapoli (*Ardisia compressa* k.) y microencapsulación con maltodextrina y capsul®” incluido en el capítulo 3, es por ello que se incluye en este anexo.

Material y métodos

Se disolvieron 500 mg de muestra en 50 mL de agua destilada, agitando manualmente por 30 minutos a temperatura. Una alícuota de 25 mL se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Una alícuota de 10 mL del sobrenadante se secó en una estufa a 110 °C durante la noche. La solubilidad (S) fue calculada por diferencia de peso y expresada en % (Arrazola *et al.*, 2014a)

Resultados

Los resultados de solubilidad (S) de la **Tabla 15** muestra que existe diferencia significativa para los diferentes tratamientos, esto se debe a que la presencia de maltodextrina aumenta la solubilidad de los polvos debido a que es muy soluble en agua. El resultado del tratamiento de maltodextrina fue mayor al reportado por Souza *et al.*, (2015) de 95.57%.

Tabla 15. Resultados de solubilidad de las microcápsulas

Tratamiento	Solubilidad (%)
MC1000	97.06 ± 0.08 ^b
MC7525	97.42 ± 0.04 ^a
MC5050	96.52 ± 0.11 ^c
MC2575	97.10 ± 0.11 ^b
MC0100	96.40 ± 0.20 ^c
DMS (0.05)	0.3043

¹Media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Tratamientos MC1000: maltodextrina 100%; MC7525: mezcla de maltodextrina 75%-Capsul 25%; MC5050: mezcla de maltodextrina 50%-Capsul 50%; MC2575: mezcla de maltodextrina 25%-Capsul 75%; MC0100: Capsul 100%.

A2 .Distribución de tamaño de partícula

Dentro de la caracterización de las microcápsulas se obtuvo la distribución de tamaño de las partículas, sin embargo no se contempló para el artículo de “Optimización de la extracción de antocianinas de chagalapoli (*Ardisia compressa* k.) y microencapsulación con maltodextrina y capsul®” incluido en el capítulo 3, es por ello que se incluye en este anexo.

Resultados

La **Figura 19** muestra la distribución del tamaño de las microcápsulas. Todos los tratamientos mostraron un tamaño de distribución de partícula entre 1 y 22 μm . La maltodextrina exhibió mayor uniformidad en el tamaño de las partículas y menor tamaño respecto a los tratamientos que contenían Capsul; el diámetro oscila entre 1.41 y 11.22 μm , mientras que en los demás tratamientos va de 2.10 a 22.28 μm de diámetro. Tonon *et al.*, (2009) reportó resultados similares para micropartículas de maltodextrina 10 DE con un diámetro promedio de 10.94 μm .

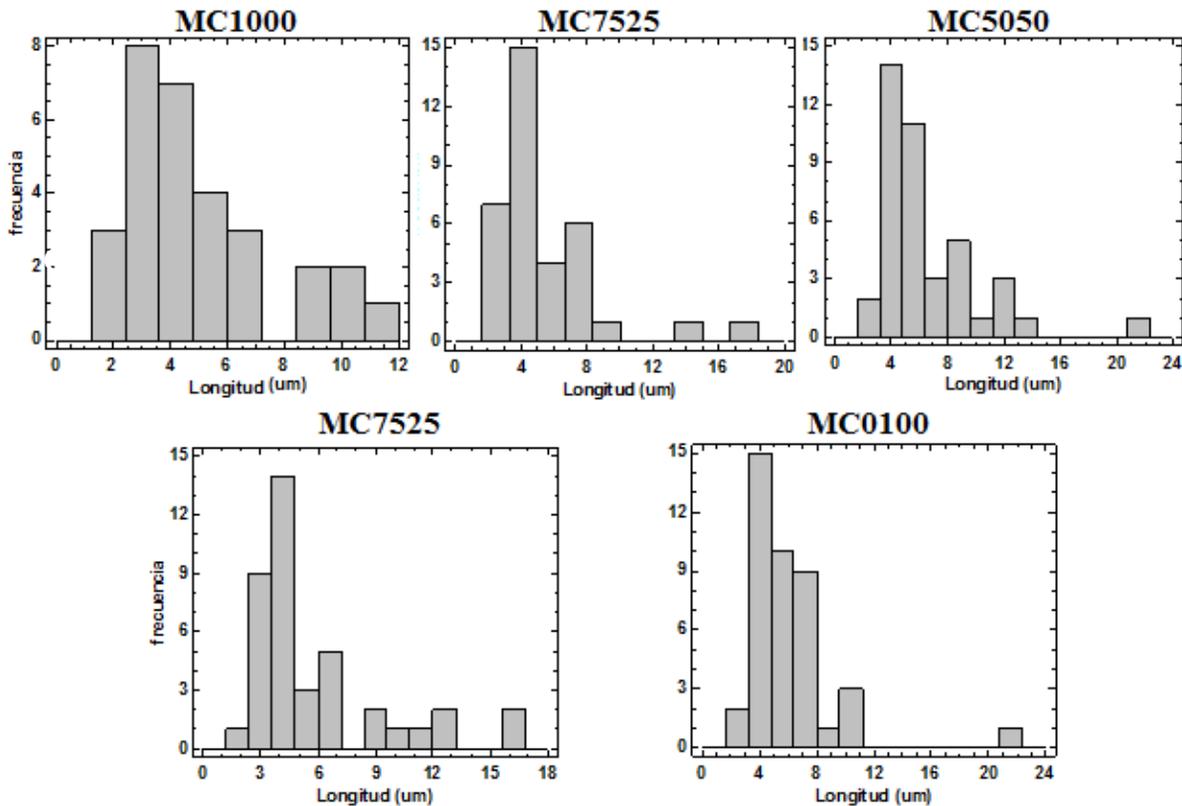


Figura 19. Distribución de tamaño de micropartículas. (A) Maltodextrina: Capsul (100:00), (B) Maltodextrina: Capsul (75:25), (C) Maltodextrina: Capsul (50:50), (D) Maltodextrina: Capsul (25:75), (E) Maltodextrina: Capsul (00:100).

A3 . Fotografías de pruebas y experimento



Figura 20. Polvos obtenidos por secado por aspersión. MDX: maltodextrina, CA: Capsul.

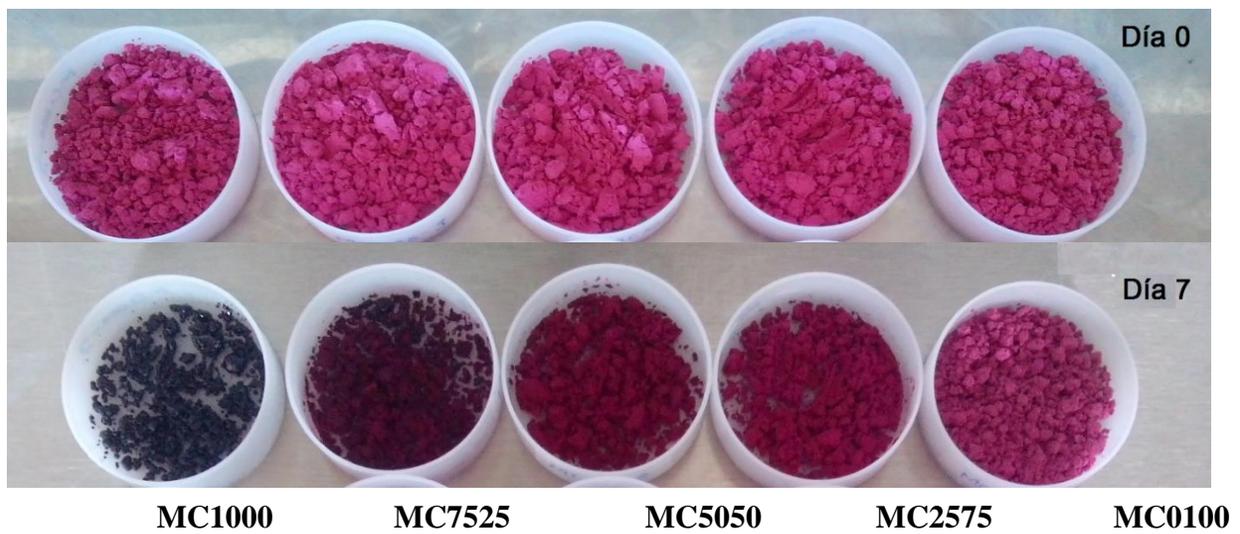


Figura 21. Características físicas de las microcápsulas al día 0 y al día 7 en la prueba de higroscopicidad.

A4 .Curvas de calibración de malvidina-3-galactosido

Tabla 16. Preparación de curva patrón para espectrofotómetro

Punto	Concentración Inicial (ppm)	Volúmen Solución patron (µl)	Concentración Final (ppm)	Volúmen disolvente (µl)	Volumen total (µl)
1	50	800	10	3200	4000
2	50	1600	20	2400	4000
3	50	2400	30	1600	4000
4	50	3200	40	800	4000
5	50	4000	50	0	4000

Disolvente utilizado: Metanol:ácido acético:agua(10:1:9)

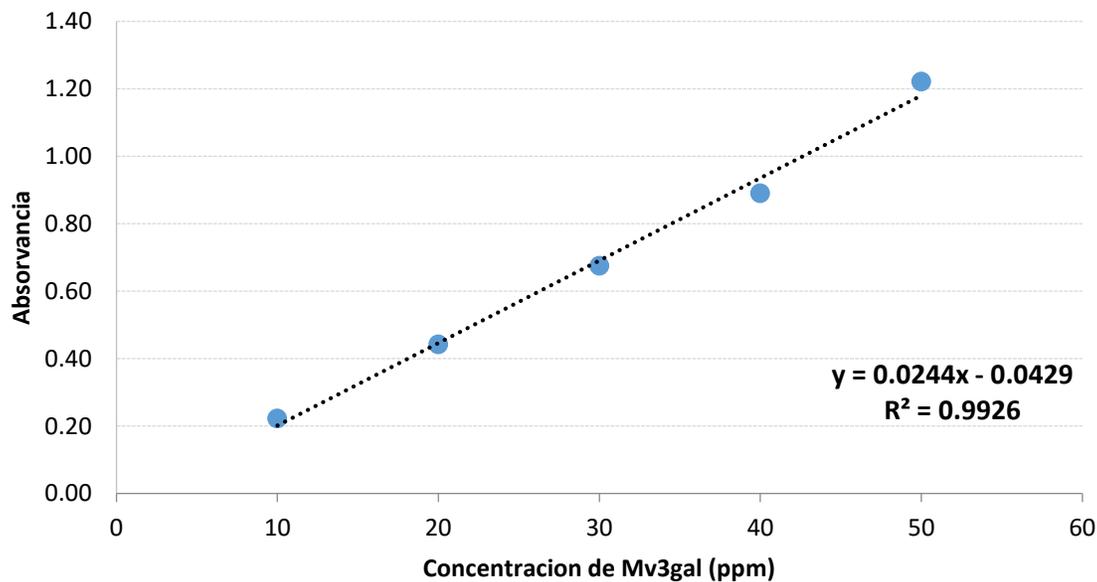


Figura 22. Curva de calibración de malvidina-3-galactosido realizada en el espectrofotómetro UV-visivle (Perkin Helmer, modelo Lambda 25) de INIFAP Centro Altos de Jalisco.

Tabla 17. Preparación de curva patrón para HPLC

Punto	Concentración Inicial (ppm)	Volúmen Solución patron (µl)	Concentración Final (ppm)	Volúmen disolvente (µl)	Volumen total (µl)
1	50	500	5	4500	5000
2	50	1000	10	4000	5000
3	50	1500	15	3500	5000
4	50	2000	20	3000	5000
5	50	2500	25	2500	5000

Disolvente utilizado: Metanol:ácido acético:agua(10:1:9)

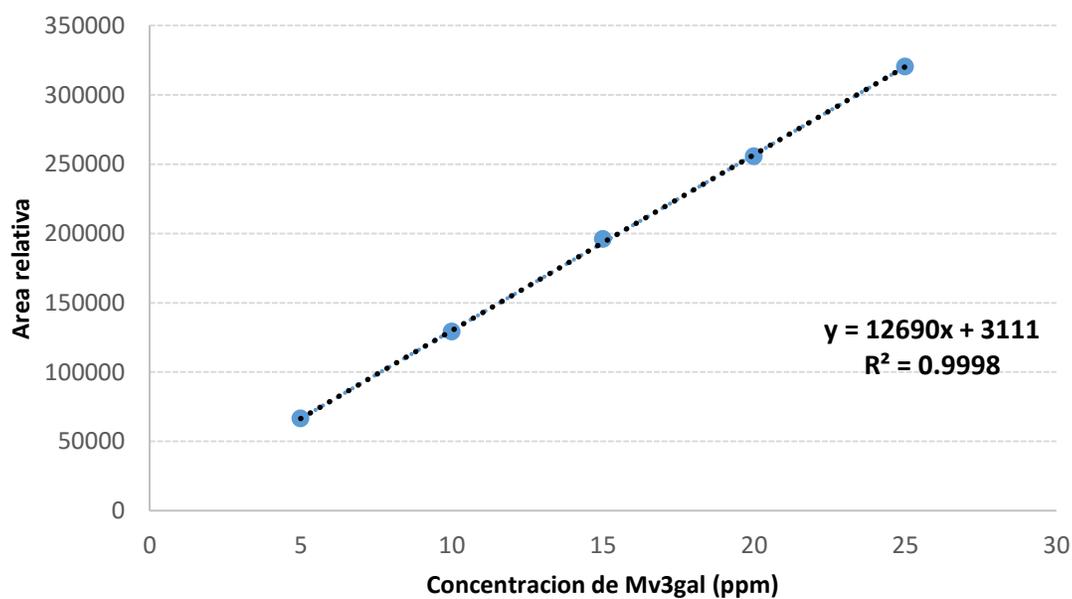


Figura 23. Curva de calibración de malvidina-3-galactosido obtenida en HPLC (Perkin-Elmer® Series 200) de INIFAP Centro Altos de Jalisco.

A5 . Resultados de análisis estadísticos

Tabla 18. Análisis ANOVA de parámetros cinéticos de degradación en la evaluación de las bebidas con microcápsulas y con extracto

F. V.	G. L	K	t1/2	R2	RA	ΔE
TRAT	1	1.76E-08	83876.3	0.000041	9.33*	3.01207
TEM	1	0.000000746**	70539972.58 **	0.06352**	3497.41 **	87.80470**
TRAT*TEM	1	1.76E-08	83876.3	0.000065	33.52**	1.21466
Error	8	4.41E-09	20969.08	0.00023	0.516	0.591
Total	11					
C. V (%)		18.23	4.028	1.659	0.9797	13.51

Tabla 19. Análisis de Correlación de Pearson para las variables evaluadas en las bebidas.

	Temp	Time	Bx	pH	Lum	a	b	Cr	Hue	AT	A1	A2	A3	A4	A5
Temp	1	0	0.1584	0	0.4413	-0.4035	-0.6531	-0.6277	-0.6352	-0.4687	-0.6220	-0.5943	-0.5825	-0.5019	-0.5582
		1	0.5579	1	0.0871	0.1211	0.0061	0.0092	0.0082	0.0671	0.0101	0.0152	0.0179	0.0476	0.0246
Time	0	1	0.0144	0.6897	0.6602	0.2256	-0.2605	-0.1278	-0.3738	-0.7331	-0.4651	-0.4160	-0.5505	-0.6484	-0.5959
	1		0.9578	0.0031	0.0054	0.4009	0.3298	0.6371	0.1537	0.0012	0.0695	0.109	0.0271	0.0066	0.0148
Bx	0.1584	0.0144	1	0.1802	-0.2425	-0.8157	-0.4247	-0.5653	-0.3470	-0.05687	-0.2171	-0.2783	-0.2033	-0.1174	-0.1854
	0.5579	0.9578		0.5043	0.3656	0.0001	0.101	0.0225	0.1879	0.8343	0.4192	0.2967	0.4501	0.665	0.4917
pH	0	0.6897	0.1802	1	0.3860	-0.1340	-0.3049	-0.2721	-0.2700	-0.4537	-0.2821	-0.2959	-0.3519	-0.4401	-0.3745
	1	0.0031	0.5043		0.1398	0.6209	0.2508	0.3079	0.3118	0.0775	0.2898	0.2658	0.1813	0.088	0.153
Lum	0.4413	0.66025	-0.2425	0.3860	1	0.0848	-0.6630	-0.4882	-0.7566	-0.9462	-0.8535	-0.7719	-0.8787	-0.9093	-0.8938
	0.0871	0.0054	0.3656	0.1398		0.7549	0.0051	0.055	0.0007	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
a	-0.4035	0.2256	-0.8157	-0.1340	0.0848	1	0.6800	0.8225	0.5545	0.1384	0.4045	0.4172	0.3508	0.2231	0.3170
	0.1211	0.4009	0.0001	0.6209	0.7549		0.0037	<0.0001	0.0258	0.6091	0.1201	0.1079	0.1828	0.4061	0.2315
b	-0.6531	-0.2605	-0.4247	-0.3049	-0.6630	0.6800	1	0.9762	-0.9744	0.7802	0.9348	0.8881	0.9051	0.8142	0.8857
	0.7469	0.3298	0.101	0.2508	0.0051	0.0037		<0.0001	<0.0001	0.0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cr	-0.6277	-0.1278	-0.5653	-0.2721	-0.4882	0.8225	0.9762	1	0.9185	0.6424	0.8429	0.8097	0.8029	0.6935	0.7776
	0.0092	0.6371	0.0225	0.3079	0.055	<0.0001	<0.0001		<0.0001	0.0073	<0.0001	0.0001	0.0002	0.0029	0.0004
Hue	-0.6352	-0.3738	-0.3470	-0.2700	-0.7566	0.5545	0.9744	0.9185	1	0.8641	0.9744	0.9162	0.9535	0.8759	0.9411
	0.0082	0.1537	0.1879	0.3118	0.0007	0.0258	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
AT	-0.4687	-0.7331	-0.0569	-0.4537	-0.9462	0.1384	0.7802	0.6424	0.8641	1	0.9324	0.8615	0.9607	0.9742	0.9750
	0.0671	0.0012	0.8343	0.0775	<0.0001	0.6091	0.0004	0.0073	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
A1	-0.6220	-0.4651	-0.2171	-0.2821	-0.8535	0.4045	0.9348	0.8429	0.9744	0.9324	1	0.9458	0.9923	0.9409	0.9841
	0.0101	0.0695	0.4192	0.2898	<0.0001	0.1201	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
A2	-0.5943	-0.4160	-0.2783	-0.2959	-0.7719	0.4172	0.8881	0.8097	0.9162	0.8615	0.9458	1	0.9527	0.9139	0.9234
	0.0152	0.109	0.2967	0.2658	0.0005	0.1079	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001
A3	-0.5825	-0.5505	-0.2033	-0.3519	-0.8787	0.3508	0.9051	0.8029	0.9535	0.9607	0.9923	0.9527	1	0.9713	0.9955
	0.0179	0.0271	0.4501	0.1813	<0.0001	0.1828	<0.0001	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001
A4	-0.5019	-0.6484	-0.1174	-0.4401	-0.9093	0.2231	0.8142	0.6935	0.8759	0.9742	0.9409	0.9139	0.9713	1	0.9766
	0.0476	0.0066	0.665	0.088	<0.0001	0.4061	0.0001	0.0029	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001
A5	-0.5582	-0.5959	-0.1854	-0.3745	-0.8938	0.3170	0.8857	0.7776	0.9411	0.9750	0.9841	0.9234	0.9955	0.9766	1
	0.0246	0.0148	0.4917	0.153	<0.0001	0.2315	<0.0001	0.0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

A6 .Resultados de ANOVA de parámetros cinéticos de degradación en polvos

F. V.	G. L	K	T1	R2	PERDIDA	RETENCION	
TRAT		4	7.42E-08	8017.01	0.00178	2.32	2.32
REP		2	1.41E-08	1582.69	0.0161**	4.65	4.65
Error		8	1.85E-08	2273.78	0.001	1.22	1.22
Total		14					
C. V (%)			9.44	9.78	3.66	11.18	1.23