UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

"Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de papas nativas (*Solanum spp.*), variedades Puca-shungo y Yana-shungo"

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Christian Israel Aranda Núñez.

Tutor: Orestes López Hernández PhD.

Ambato-Ecuador

Marzo 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 31 Enero del 2018

PhD. Orestes Darío López Hernández
C.I. 1754784864
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Christian Israel Aranda Núñez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

Sr. Christian Israel Aranda Núñez
C.I. 1804356747
AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Lic. Mg Yunys Pérez Betancourt
C.I. 175647274-0

Lic. Mg Dannae Fernández Rivero
C.I. 175718120-9

Ambato, 01 de Marzo de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Sr. Christian Israel Aranda Núñez
C.I. 1804356747
AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres "Mis Viejitos" por su cariño, sacrificio, sus muestras de apoyo, consejos y por todos los valores inculcados día a día me han permitido cumplir con uno de los objetivos planteados en mi vida. A mis hermanos que gracias a su experiencia y por considerarme el menor de la familia siempre estuvieron ahí dándome mucha fuerza para no desertar en ningún momento. A Denny que con su cariño y amor supo ganarse un lugar muy importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato y a sus profesores por haber contribuido en mi formación profesional

Al PhD. Orestes López. Doc gracias por el apoyo y por ser el guía en el proceso de elaboración y ejecución del proyecto de titulación. Además de manera especial muchas gracias por poner a mi disposición todo su conocimiento, por todo el apoyo y la confianza brindada, demostró que sabe manejarse correctamente tanto como profesional y como persona

A la ingeniera Mónica Silva porque gracias a su experiencia y conocimientos pude dar inicio a mi proyecto ayudándome a despejar varias dudas y por darme todas las facilidades para poder trabajar.

A la Dra. Yenddy Carrero por haberme facilitado todos los medios y materiales para poder continuar con la parte experimental de mi proyecto, de igual manera gracias por preocuparse de que siempre las cosas salieran de la mejor manera, por el compromiso y la paciencia que tiene con sus estudiantes

A Pato, Lauro, Titu, Bolo, Tavo, Pedro conocidos, amigos con los que compartimos experiencias más allá de la universidad y todas las demás personas que conocí en esta etapa de mi vida

A Michael y Jenny por haberme ayudado a realizar un buen trabajo en el tiempo que estuve en el laboratorio y a todos mis demás compañeros con los que compartí en este lugar.

A mis primos, sobrinos y amigos de barrio de toda la vida que pese a los distintos caminos que hemos tomado seguimos llevando una buena amistad

ÍNDICE DE CONTENIDOS
TRABAJO DE TITULACIÓN

MODALIDAD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PÁGINAS PRELIMINARES

Portada I

Aprobación del tutor II

Declaración de autenticidad III

Aprobación de los miembros del tribunal de grado IV

Derechos de autor V

Dedicatoria VI

Agradecimientos VII

Resumen XIII

Abstract XIV

Introducción 1

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema 3

1.2 Justificación 3

1.3 Objetivos 4

1.3.1 Objetivo General 5

1.3.2 Objetivos Específicos 5

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos 6

2.1.1 Papas nativas 6

2.1.2 Microencapsulación mediante secado por aspersión 8

2.1.3 Antocianinas 10

2.1.4 Apoptosis 12

2.2 Hipótesis 13

2.2.1 Estudio del contenido de antocianinas de las papas nativas coloreadas Puca-shungo y Yana-shungo 13

2.2.2 Evaluación del efecto de la temeperatura y tiempo en el proceso de extracción de antocianinas 13

2.2.3 Efecto citotóxico y actividad proapoptotica de la microcapsulas de antocianinas de papa morada mediante ensayos de MTT utilizando células HeLa infectadas con HPV18 14

2.3 Señalamiento de variables 14

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales 15

3.1.1 Para la extracción y determinación de antocianinas 15

3.1.2 Para la microencapsulación de antocianinas 15

3.1.3 Para ensayos citotóxicos e inmunocitoquímicos 16

3.1.4 Equipos 16

3.2 Métodos 17

3.2.1 Obtención de harina de papa morada 17

3.2.2 Extracción de antocianinas de papa morada 17

3.2.3 Determinación de antocianinas de papa morada 19

3.2.4 Microencapsulación de antocianinas mediante Spray-dryer 19

3.2.5 Espectrofotometría Infrarroja FT-IR 20

3.2.6 Evaluación citotóxica y proapoptotica 21

3.3 Diseño Experimental 24

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados 25

4.2 Verificación de las hipótesis 38

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones 40

5.2 Recomendaciones: 41

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 42

ANEXOS: 47

Anexo A. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Fan et al., 2008) 47
Anexo B. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Giusti & Wrolstad, 2001)..... 47
Anexo C. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Abdel-Aal & Hucl, 1999) 47
Anexo D. Datos del diseño experimental de parámetros optimizados en el proceso de extracción de antocianinas 48
Anexo E. Tablas de Annova de cada uno de los métodos utilizados para la extracción de antocianinas..... 48
Anexo F. Secado de ojuelas y obtención de harina de papa 49
Anexo G. Evaporación del solvente y microencapsulado de antocianinas 50
Anexo H. Espectrofotometría infrarroja 50
Anexo I. Cultivo y crecimimento celular..... 51
Anexo J. Lector de placas de 96 pocillos para ensayo de MTT..... 51
Anexo K. Concentración de antocianinas % de viabilidad de células para la elaboración de la curva del MTT a pH 1,42 y pH 3,43..... 51
Anexo L. Microscopia de fluoresencia 52
Anexo M. Conteo de células totales, positivas y colocalización para realizar el análisis estadístico de los ensayos inmunocitoquímicos..... 53
Anexo N. Medias DS del número de células positivas e intensidad de expresión en células control y tratadas..... 54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características morfológicas de la variedad INIAP-Yana Shungo 7
Tabla 2. Características de calidad de la variedad INIAP-Yana-Shungo 7
Tabla 3. Principales características morfológicas de la variedad INIAP-Puca Shungo..... 8
Tabla 4. Características de calidad de la variedad INIAP-Puca Shungo 8
Tabla 5 Datos de harina y concentrado de antocianinas 29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variedad INIAP-Yana-Shungo 6
Figura 2. Variedad INIAP-Puca-Shungo 7
Figura 3. Estructura básica y principales sustituyentes de las antocianinas 11
Figura 4. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método 1 propuesto por (Fan et al., 2008) 25
Figura 5. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método 2 propuesto por (Giusti & Wrolstad, 2001) 25
Figura 6. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Abdel-Aal & Hucl, 1999) 26
Figura 7. Comparación de los tres métodos utilizados en la extracción de antocianinas 27
Figura 8. Resultados del diseño experimental con los parámetros optimizados para la extracción de antocianinas de papa variedad Yana-shungo 28
Figura 9. Espectros de FTIR del producto microencapsulado en comparación con el producto sin microencapsular y el polímero utilizado. 31
Figura 10. FTIR de compuestos antociánicos presentes en hierba santa (Cestrum hediondinum D.) 32
Figura 11. Porcentajes de viabilidad celular según el método de MTT en células HeLa, tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de antocianinas de papa morada variedad Yana-shungo, a las 24 h de incubación 33
Figura 12. Expresión de Bax, Bcl2 y Caspasa 8 en células HeLa tratadas con microencapsulado de antocianinas de papa morada (Solanum andígena) a pH 1,42 y pH 3,43 de acuerdo al número de células positivas por campo e intensidad empleando filtros GFP (488- 510nm) y DAPI (461-500nm) con una magnificación 630X 35
Figura 13. Expresión de Bax, Bcl2 y Caspasa 8 en células HeLa tratadas con microencapsulado de antocianinas de papa morada 37

RESUMEN

Las antocianinas son metabolitos secundarios y pertenecen a la familia de los flavonoides. Tienen tonalidades que van del rojo, naranja, violeta, púrpura y azul. El objetivo de este estudio fue extraer y microencapsular antocianinas de papa nativa (*Solanum spp.*) variedades Puca-shungo (piel color rojiza) y Yana-shungo (piel color violeta). La harina de cada variedad de papa se sometió a extracción con solvente (etanol-ácido clorhídrico) a diferentes relaciones harina-solvente y tiempos de extracción. Un proceso óptimo para la extracción de antocianinas se presentó a una temperatura de 68±1°C, harina-solvente 1:20, tiempo 60 minutos y pH 1. Se microencapsularon con maltodextrina a temperatura de entrada 180 °C y temperatura de salida 90 °C. Se realizaron ensayos de espectroscopia infrarroja para verificar la microencapsulación de las antocianinas. Para los ensayos *in vitro* de citotoxicidad e inmunocitoquímicos se utilizaron células HeLa (ATCC®CCL-2 ™). Se trabajó con dos valores de pH del microencapsulado de antocianinas pH 1, 42 y pH 3, 43 para estos ensayos. La actividad citotóxica se cuantificó mediante un método colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los ensayos inmunocitoquímicos de expresión de Bax, Bcl2 y caspasa 8 se realizaron mediante técnicas de microscopía de fluorescencia. La concentración final de antocianinas alcanzada en el microencapsulado fue de 168,5mg/100g. El ensayo de citotoxicidad evidenció un índice de concentración inhibitoria máxima media (IC50) de 0,0055mg/ml a un valor de pH 1,42 y 0,00049mg/ml a pH 3,43. Adicionalmente se pudo verificar y cuantificar la expresión de Bax Bcl2 y caspasa 8.

Palabras clave: papa nativa, antocianinas, microencapsulación, citotoxicidad, apoptosis.

ABSTRACT

Anthocyanins are secondary metabolites and belong to the flavonoid family. They have tonalities ranging from red, orange, violet, purple and blue. The objective of this study was to extract and microencapsulate anthocyanins from native potato (Solanum spp.) Varieties Puca-shungo (reddish skin) and Yana-shungo (violet skin). The flour of each potato variety was subjected to extraction with solvent (ethanol-hydrochloric acid) at different flour-solvent ratios and extraction times. An optimal process for the extraction of anthocyanins was presented at a temperature of 68 ± 1 ° C, flour-solvent 1:20, time 60 minutes and pH 1. They were microencapsulated with maltodextrin at the inlet temperature 180 ° C and outlet temperature 90 ° C. Infrared spectroscopy tests were performed to verify the microencapsulation of anthocyanins. HeLa cells (ATCC®CCL-2 ™) were used for in vitro cytotoxicity and immunocytochemical assays. We worked with two pH values of anthocyanin microencapsulation pH 1, 42 and pH 3, 43 for these tests. The cytotoxic activity was quantified by a colorimetric method of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole (MTT) bromide. Immunocytochemical assays of Bax, Bcl2 and caspase 8 expression were performed by fluorescence microscopy techniques. The final concentration of anthocyanins reached in the microencapsulation was 168.5mg / 100g. The cytotoxicity test showed an index of mean maximum inhibitory concentration (IC50) of 0.0055mg / ml at a pH of 1.42 and 0.00049mg / ml at pH 3.43. Additionally, the expression of Bax Bcl2 and caspase 8 could be verified and quantified.

Key words: native potatoes, anthocyanins, microencapsulation, cytotoxicity, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El reino vegetal ha sido desde el inicio de los tiempos la principal fuente de recursos para el ser humano ayudando a cubrir varias necesidades como: alimentación, construcción, vestimenta y medicina.

Hoy en día debido a los avances tecnológicos, científicos y gracias a los conocimientos de medicina tradicional acerca de las propiedades curativas que poseen las plantas se ha dado un nuevo enfoque en analizar y conocer todos los componentes de las plantas para identificar a cuál de estos deben su acción farmacológica (Garzón-Garzón, 2016). Según Ashraf, Sarfraz, Rashid, & Shahid, (2015) la Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta el año 2006 ha estudiado 20000 especies de plantas con fines médicos, además menciona que los principios activos principalmente son metabolitos secundarios que se pueden encontrar en cualquier parte de las plantas. Estos principios activos pertenecen a tres grupos principales: polifenoles, terpenoides y alcaloides.

La papa se desarrolló y cultivó por primera vez en las cercanías del Lago Titicaca, junto a la frontera actual entre Perú y Bolivia, las poblaciones andinas empezaron a comer patatas silvestres 3.000 a 4.000 años antes de nuestra era (C. Monteros, Cuesta, Jimenez, & López, 2005). En el mundo se cultivan cerca de 5000 variedades de papa. Las poblaciones preincaicas daban usos diferentes a las papas, las colocaban crudas para sanar los huesos rotos, para prevenir el reumatismo y las comían mezcladas con otros alimentos para mejorar la digestión (Monteros Guerrero, 2016). La papa tiene un alto contenido de carbohidratos, recién cosechada, contiene un 80 % de agua y un 20 % de materia seca. Entre el 60 y el 80 % de esta materia seca es almidón, además, la papa tiene poca grasa, posee abundantes micronutrientes como vitamina C, una cantidad moderada de hierro, tiene vitaminas B_1, B_3 y B_6, y otros minerales como potasio, fósforo y magnesio, así como folato, ácido pantoténico y riboflavina (FAO, 2008). También contiene antioxidantes alimentarios, los cuales pueden contribuir a prevenir enfermedades relacionadas con el envejecimiento, tiene fibra, cuyo consumo es bueno para la salud (INIAP & CIP, 2002).

Además de las papas que están destinadas al consumo humano existen otras variedades poco conocidas nativas del Ecuador que han aparecido debido a los cruces de varias especies durante miles de años. Estas variedades de papas (INIAP-Yana shungo e

INIAP-Puca shungo) se caracterizan por tener pulpas coloreadas moradas y rojas respectivamente (C. Monteros, Cuesta, Jimenez, & López, 2013). Esta singular característica se debe a las antocianinas que son metabolitos secundarios de las plantas. Están presentes de forma natural como glucósidos que tienen glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa o arabinosa adjunta al núcleo aglicón, entre sus principales características se encuentran que son hidrosolubles, pertenecen al grupo de los flavonoides, se acumulan en las vacuolas de las células, se les atribuye funciones como protección UV, atracción de animales para la polinización y dispersión de semillas, defensa contra patógenos y plagas y protección del ADN y el aparato fotosintético de altos flujos de radiación (Szymanowska, Złotek, Karaš, & Baraniak, 2015). A parte de cumplir con dichas funciones para las plantas las antocianinas pueden ser absorbidas directamente por el ser humano y distribuidas en la sangre por lo que el consumo moderado de antocianinas a través de la ingesta de productos ricos en estos compuestos se asocia con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y además mejora de la función visual (Aguilera Ortíz M, Reza Vargas MC, Chew Madinaveitia RG, 2011). En los últimos años han llamado especial atención dentro del campo de la investigación científica debido a sus habilidades para inhibir el estrés oxidativo, carcinogénesis celular e inducir apoptosis en células malignas. Un mayor conocimiento acerca de las antocianinas puede llegar a facilitar el desarrollo de nuevos enfoques y estrategias para la prevención y tratamiento del cáncer (Hou, 2003).

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, sólo por detrás de las enfermedades cardiovasculares. Los fármacos utilizados actualmente para su tratamiento tienen una limitada actividad y causan una variedad de efectos indeseables que incluyen toxicidad cardiaca, pulmonar, neurológica y renal. Por lo tanto, es imperioso descubrir nuevos agentes anticancerosos con mayor eficacia y elevada selectividad por células tumorales (Kladniew, Villegas, García, & Bravo, 2016).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema

"Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de papas nativas (*Solanum spp.*), variedades Puca-Shungo y Yana-shungo"

1.2 Justificación

La papa es uno de los principales productos que se cultivan a nivel mundial y en el país según Cuichán et al., (2014) ocupa el séptimo lugar de producción ya que su superficie plantada llega a las 36 mil hectáreas, y está presente en 12 provincias del país. Debido a las características óptimas de los suelos que están ubicados en la zona central del Ecuador, la producción de papa está destinada para la alimentación por lo que se necesita cultivar especies que generen rentabilidad a los productores y satisfagan la demanda generada (Ramos, 2008). Se de lado a especies nativas que han sido conservadas por miles de años, ocasionando que estén en peligro de extinción, especialmente las de pulpa de colores, debido a las pocas oportunidades de mercado y al desconocimiento de sus bondades (Monteros & Pallo, 2009).

La variedad INIAP-Yana Shungo proviene de una autofecundación de la variedad nativa Chaucha (HSO 213), principalmente se cultiva a 3000 o 3300 m sobre el nivel del mar y la forma de su tubérculo es oblonga concertinada, piel de color negruzco de intensidad, esto se debe al alto contenido de polifenoles que posee al igual que la variedad INIAP-Puca Shungo que proviene de la autofecundación de la variedad Chaucha camote (BOM 532), contiene una pulpa de color rojo con piel rojo morada y forma comprimida. (Monteros et al., 2011).

Las antocianinas que contienen varias frutas y vegetales son hidrosolubles y no tóxicas por lo que se están utilizando como colorante de alimentos y en los últimos años se ha despertado un mayor interés dentro del mundo de la investigación debido a

la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres (López-Alarcón, C.; Denicola, 2013), lo que hace que sean beneficiosas para la salud combatiendo enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras (Castañeda., *et al*, 2009; Moldovan, B, David L, Chişbora C, 2012). Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides. El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Aguilera-Otíz & Reza-Vargas, 2011).

Existen diversos factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas. La estructura de éstas puede verse afectada en cualquier etapa de un proceso tecnológico, como por ejemplo un proceso de extracción de antocianinas de un material vegetal, como así también durante un tratamiento térmico o durante el almacenamiento de un producto que las contiene. El proceso de microencapsulación favorece a la modificación de las características físicas del material para facilitar su uso, control de la liberación del componente activo, y el enmascaramiento de aromas o sabores (Desai, K. y Park, 2005). El método de microencapsulación de secado por aspersión consiste en la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una solución, emulsión o suspensión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la corriente de alimentación, quede atrapado dentro de una película de material encapsulante (López, 2010).

El estudio de metabolitos secundarios de las plantas ha desarrollado un gran interés en los últimos años debido a la variedad de compuestos y a los beneficios que puede traer para el ser humano (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015). Uno de esos metabolitos de las plantas son las antocianinas que se encuentran en la papa morada. Las antocianinas tienen gran aplicabilidad, en la industria alimentaria como colorante natural y en el campo de la investigación se han realizado varios estudios acerca de su potencial antioxidante y antitumoral (Bermúdez, Díaz-Moreno, & Fuenmayor, 2016).

Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Extraer antocianinas de papa morada (*Solanum andígena*) para su posterior microencapsulación mediante secado por aspersión y evaluar su actividad proapoptotica *in vitro* en células HeLa.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la variedad de papa nativa coloreada que mayor contenido de antocianinas posee.
- Estudiar la influencia de diferentes parámetros sobre el proceso de extracción de antocianinas.
- Evaluar el efecto citotóxico de las microcápsulas mediante ensayos de MTT.
- Evaluar el efecto proapoptótico de las antocianinas microencapsuladas *in vitro* en células HeLa mediante la determinación de Bax, Bcl_2 y caspasa 8 por inmunocitoquimica.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

2.1.1 Papas nativas

Las papas nativas fueron cultivadas desde hace 4000 años A.C. resultaron de un proceso de domesticación, selección y conservación ancestrales de los habitantes de las zonas andinas, se considera como un sustento de vida por el papel que cumple en la dieta de los pueblos alto andinos (INIAP, 2010). Las variedades nativas son poco conocidas por los consumidores, pero muy valoradas por agricultores debido a su sabor, textura, tolerancia a sequias y científicos ya que estas especies de papas son fuente de genes para realizar un mejoramiento genético de otras variedades de papa (Monteros Guerrero, 2016). Las variedades nativas tienen formas y colores llamativos y exóticos existen variedades que poseen pulpa y piel amarillo, rojo, rosado, morado con alto contenido de carotenoides, antocianinas y flavonoides, a diferencia de las papas mejoradas las variedades nativas tienen mayor contenido de hierro, vitamina C, sólidos y mayor concentración de almidones. (FAO, 2008; INIAP, 2010).

2.1.1.1 Variedad INIAP-Yana Shungo (*Solanum andígena*)

Figura 1. Variedad INIAP-Yana-Shungo

Tabla 1. Principales características morfológicas de la variedad INIAP-Yana Shungo

Partes	Características
Plantas	Vigorosa, con hábito de crecimiento semi-erecto.
Hojas	Color verde oscuro, abiertas, disectadas. Cuatro pares de foliolos laterales y dos pares de inter-hojuelas entre foliolos.
Tallos	Suculentos, robustos, de pigmentación morada con pocas áreas verdes y presencia de alas rectas.
Flores	Color blanco claro sin color secundario, la corola es semi-estrellada, el cáliz presenta pigmentación púrpura con abundante verde, el pedicelo es ligeramente pigmentado a lo largo y en la articulación. Las anteras y el pistilo no presentan pigmentación.
Frutos	Baya globosa de color verde intenso.
Tubérculo	Forma oblonga concertinada, piel de color negruzco de intensidad intermedia con manchas dispersas moradas, pulpa crema con anillo vascular y médula de color morado. Ojos profundos; brotes de color morado.

Fuente: INIAP, 2011

Tabla 2. Características de calidad de la variedad INIAP-Yana-Shungo

VARIABLES	PARÁMETROS
Materia seca (%)*	20,1-22,0
Proteína (%)*	10-11
Azúcares reductores (%)*	0,10-0,19
Polifenoles (mg/100g)*	198-385
Verdeamiento (días) *	40-50
P (%)*	0,18-0,20
Mg (%)*	0,08-0,17
K (%)*	2,60-3,85
Na (%)*	0,02-0,03
Cu (ppm)*	5-6
Fe (ppm)*	82-86
Mn (ppm)*	2-4
Zn (ppm)*	11-13

Fuente: Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP (2011)

*** Datos en base seca**

2.1.1.2 Variedad INIAP-Puca Shungo

Figura 2. Variedad INIAP-Puca-Shungo

Tabla 3. Principales características morfológicas de la variedad INIAP-Puca Shungo

Partes	Características
Brotes	Rojos morados.
Tallos	Verdes con pocas manchas púrpuras y alas rectas.
Flores	Blancas con bandas lila claro en el énves, semiestrellada, cáliz verde con pocas manchas purpuras, pedicelo pigmentado sobre la articulación, anteras y pistilo sin pigmentación
Frutos	Baya globosa de color verde con puntos blancos
Tubérculo	Piel rojo morado forma comprimida con ojos medios, pulpa crema con anillo vascular y médula rojo morada.

Fuente: INIAP, 2011

Tabla 4. Características de calidad de la variedad INIAP-Puca Shungo

VARIABLES	PARÁMETROS
Materia seca (%)	19,5-22,7
Proteína (%)*	7-9
Azúcares reductores (%)	0,21-0,25
Polifenoles (mg/100g)*	189-230
Tiempo de cocción (minutos)	25-30
Ca (%)*	0,03-0,060
P (%)*	0,13-0,17
Mg (%)*	0,08-0,13
K (%)*	2,45-3,81
Na (%)*	0,02-0,03
Cu (ppm)*	2,0-3,0
Fe (ppm)*	61-86
Mn (ppm)*	2.0-3.0
Zn (ppm)*	9-10

Fuente: Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP (2011)

*** Datos en base seca**

2.1.2 Microencapsulación mediante secado por aspersión

La microencapsulación ha sido utilizada en la industria alimentaria por más de 60 años y las primeras investigaciones en el área farmacéutica fueron realizadas en la Universidad de Wisconsin (Estados Unidos), y datan de los años 50 (Desai, K. y Park, 2005). Es una técnica que se ha aplicado para preservar, proteger, empaquetar numerosos ingredientes. Puede considerarse una forma especial de empacar materiales sólidos, líquidos y gases en miniatura con lo que se puede conseguir mayor estabilidad frente a factores externos, impedir que sufran reacciones de oxidación, además de la liberación controlada del contenido de las microcápsulas a velocidades específicas (Esquivel-González B.E., 2015; López, 2010) .

El proceso de microencapsulación consiste en el revestimiento o atrapamiento de un material puro o una mezcla dentro de otro material, formando una cápsula cuyo tamaño

puede oscilar entre 5-300 micrones de diámetro (Reyes, 2010). El material contenido en el interior es generalmente un líquido, pero también puede ser un sólido o un gas, el cual es conocido como material núcleo, activo, fase interna o carga útil. El material de revestimiento es llamado cápsula, membrana, material de pared, acarreador o caparazón que puede ser un carbohidrato o material polimérico (Esquivel-González B.E., 2015).

El principio del secado por aspersión consiste en la obtención de un polvo seco por medio de la atomización de una solución, emulsión o suspensión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado, en la cual el agua se evapora instantáneamente, lo que permite que el material activo presente en la solución, emulsión o suspensión se microencapsule o quede protegido por una película del polímero elegido como microencapsulante (Kalušević et al., 2017) .

Las ventajas de este proceso, en comparación con otros métodos de microencapsulación, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales muy volátiles y sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s), mientras que muestra desventajas al momento de microencapsular sustancias altamente viscosas, además de no proporcionar un control de condiciones en la cámara para poder ajustar el tamaño de la 4 (López, 2010; Villena Martín MJ, Hernández Morales ME, 2009).

Los principales encapsulantes utilizados para este método son: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, sacarosa, dextrana, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa); gomas (arábiga, mezquite, guar, alginato de sodio, carragenina); lípidos (ceras, parafinas, grasas, ácido esteárico, tristearina, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína, gluten, caseína) (López, 2010; Rigon & Zapata Noreña, 2016). Los encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersión y tener muy buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación (Kalušević et al., 2017)

El principal agente microencapsulante y que se utilizara en este trabajo es la maltodextrina que es elaborada por métodos de hidrólisis ácida o enzimática de los almidones. En la selección de materiales de pared para encapsular, la maltodextrina es una buena solución entre el costo y la efectividad; tiene baja viscosidad a alta

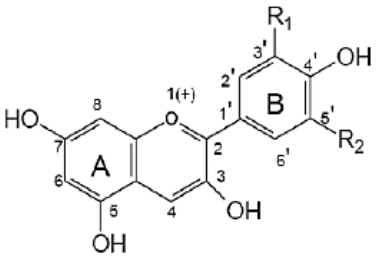
proporción de sólidos, son inodoras, incoloras y de baja viscosidad a altas concentraciones, además permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original (Reyes, 2010).

2.1.3 Antocianinas

Son hidrosolubles y son los responsables de las 20 variedades de tonalidades que van del rojo, naranja, violeta, púrpura y azul. Las antocianinas tienen una mayor concentración en flores y frutas, pero también están presentes en hojas, tallos, órganos de almacenamiento y granos. Se consideran como colorantes naturales que han despertado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios (Castañeda et al., 2009). Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras. Estos atributos de las antocianinas, colorantes y antioxidantes, resultan de interés a efectos de estudiar metodologías de extracción para poder utilizar posteriormente el producto en aplicaciones tecnológicas, especialmente como ingrediente en la industria alimentaria e incorporarlo a alimentos y bebidas (Moldovan B, David L, Chişbora C, 2012).

Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones debido a su estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo. Las propiedades atribuidas a las antocianinas para mejorar la salud están asociadas a esta capacidad de actuar como antioxidantes y secuestrar radicales libres en sistemas biológicos ya que pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática (Ortíz et al., 2011). En relación a la extracción, el método usual de extracción es la extracción sólido-líquido. El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados disolventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos, además de factores como la temperatura y la luz (Pereira-Kechinski et al., 2010).

Pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos. El nivel de hidroxilación y metilación en el anillo “B” de la molécula determina el tipo de antocianidina, que es la aglicona de la antocianina (Aguilera-Otíz & Reza-Vargas, 2011). Aunque se han descrito doce diferentes antocianidinas, las más comunes en plantas son: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina. Las tres primeras son más frecuentes en frutos, en tanto que el resto lo son en flores. En las plantas las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glucosilada; esto es, unidas a algún azúcar y en cuyo caso se denominan antocianinas. El azúcar presente en la molécula les confiere una gran solubilidad y estabilidad, generalmente se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico, pero puede también hacerlo en las posiciones 5 y 7 (Zapata et al., 2014) .En algunos casos, los azúcares están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (p-cumárico, caféico, ferúlico o sináptico). Se ha observado que la presencia de estos grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura. Normalmente se enccuentran disueltos uniformemente en la solución vacuolar de células epidérmicas. Sin embargo, en ciertas especies, las antocianinas son localizadas en regiones discretas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos (Salinas M. Y., 2010).



Aglicona	Sustituyentes		λmáx (nm)
	R1	R2	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura 3. Estructura básica y principales sustituyentes de las antocianinas

Actualmente, las antocianinas de maíz morado y azul están siendo usadas para la producción de tortillas azules coloreadas naturalmente. La incorporación de antocianinas como colorantes alimenticios, además de mejorar la apariencia total, son muy benéficas para nuestra salud. Diversos estudios presentan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores. Las antocianinas también juegan un papel en las propiedades antidiabéticas tales como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores (Shipp, 2010).

2.1.4 Apoptosis

El término apoptosis proviene del término griego que significa "caída de las hojas". Es una muerte celular programada que involucra participación activa de las células afectadas, cuyo objetivo principal es mantener la homeostasis de las poblaciones celulares, hace referencia a situaciones en las cuales las células activan un programa letal que se encuentra codificado en el genoma, que en un momento preciso, selecciona determinadas células para morir (Angosto María Cascales, 2003). La desregulación de este proceso puede conducir a estados patológicos que involucran a enfermedades con excesiva acumulación celular (falta apoptosis) o con excesiva pérdida celular (Baar et al., 2017). El proceso de apoptosis se da mediante dos vías la intrínseca o mediada por mitocondrias está regulada por la familia de proteínas leucemia/linfoma 2 de las células B (Bcl 2), controlan la permeabilidad de la membrana mitocondrial mediante un conjunto de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1), todo este proceso depende del bloqueo (no apoptosis) o la liberación (apoptosis) del citocromo-c y la vía extrínseca o mediada por receptores, es decir inicia con la interacción del ligando con un receptor de muerte que lleva a la activación de la caspasas específicas (Balmaceda, 2010; Espinosa, 2014).

Las células que sufren apoptosis tienen una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos (Ramírez-García et al., 2014). Los cuerpos

apoptóticos son fagocitados por macrófagos o por células vecinas. Las señales que desencadenan la apoptosis incluyen, daño celular causado por radiaciones ionizantes, infección vírica o señales extracelulares (Sosa, 2012). En el programa de suicidio celular interviene la transcripción de genes específicos y su traducción, lo cual permite suprimir tal suicidio inhibiendo tanto la transcripción como la traducción (Flores-Balcázar et al., 2015). La necrosis es otro tipo de muerte celular y se diferencia de la apoptosis en que es una muerte accidental causada por daños mecánicos, lesiones o toxicidad, aquí las células y sus orgánulos se hinchan debido al paso descontrolado de iones y agua, provocando que exploten y viertan su contenido en el espacio intercelular, lo que a su vez origina inflamación en las poblaciones de células adyacentes (Ates et al., 2016; Opferman & Kothari, 2017).

2.2 Hipótesis

2.2.1 Estudio del contenido de antocianinas de las papas nativas coloreadas Puca-shungo y Yana-shungo

Hipótesis Nula

La variedad de papa nativa Yana-hungo no posee mayor contenido de antocianinas que la variedad Puca-shungo

Hipótesis Alternativa

La variedad de papa nativa coloreada Yana-shungo posee mayor contenido de antocianinas que la variedad Puca-shungo

2.2.2 Evaluación del efecto de la temperatura y tiempo en el proceso de extracción de antocianinas

Hipótesis Nula

La variación de la temperatura y el tiempo en el proceso de extracción de antocianinas no afectan su concentración

Hipótesis Alternativa

La variación de la temperatura y el tiempo en el proceso de extracción de antocianinas afectan su concentración

2.2.3 Efecto citotóxico y actividad proapoptotica de la microcápsulas de antocianinas de papa morada mediante ensayos de MTT utilizando células HeLa infectadas con HPV18

Hipótesis Nula

Las microcápsulas de antocianinas de papa morada no tienen ningún efecto citotóxico ni actividad proapoptotica sobre células HeLa infectadas con HPV18.

Hipótesis Alternativa

Las microcápsulas de antocianinas de papa morada tienen efecto citotóxico y actividad proapoptotica sobre células HeLa infectadas con HPV18.

2.3 Señalamiento de variables

Variable independiente

Tiempo, disolventes, relación sólido-líquido, temperatura

Variable dependiente

Concentración de antocianinas, microencapsulación, efecto citotóxico y actividad proapoptotica.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Para la extracción y determinación de antocianinas

- Etanol 96 %
- Ácido clorhídrico (Thermo Scientific)37 % pureza
- Agua destilada
- Vasos de precipitación de 50, 250, 500, 1000 ml (Boro 3.3)
- Pipetas volumétricas y serológicas de 1 y 3 ml
- Probetas de 100, 250, 500 ml (Boro 3.3)
- Balones de aforo de 25,50, 250 y 1000 ml
- Termómetro de mercurio de 100 °C (Ap. ± 1,0 °C)
- Celda de cuarzo (ThermoElectron 10 mm)
- Micropipeta de 1 ml
- Reactor de acero inoxidable de 4 l
- Pera de succión
- Envases ámbar de 100 ml
- Cápsulas de porcelana

3.1.2 Para la microencapsulación de antocianinas

- Extracto de papas nativas (Solanum spp.) de la variedad Yana-shungo del Consorcio de Productores de Papa de la Región Central del Ecuador (CONPAPA)
- Maltodextrina DE 10 MEELUNIE B.V.

3.1.3 Para ensayos citotóxicos e inmunocitoquímicos

- Células HeLa (ATCC®CCL-2 ™)
- Frascas para cultivo de células 75ml (Thermo Sceintific)
- Placas de 96 pocillos (Thermo Sceintific)
- Placas de 6 pocillos (Thermo Sceintific)
- DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)
- Suero Fetal Bovino (FBS)
- Penicilina y estreptomicina (P/S)
- Buffer fosfato salino (PBS)
- Tripsina EDTA 0,25 %
- Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %
- 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)
- Anticuerpos primarios:Bax Antibody (6A7) sc-23959, Bcl-2 Anticuerpo (7) sc-130308, caspase-8 Anticuerpo conjugado (8CSP03) sc-56070 (Santa Cruz Biotechnology, inc)
- Anticuerpos secundarios: IgG kappa de ratón conjugada a fluoresceina (FITC) (m-IgGκ BP-FITC Santa Cruz Biotechnology, inc), BCl2 se empleò la proteína de unión a IgG kappa de ratón conjugada a ficoeritrina (PE) (m-IgGκ BP-PE Santa Cruz Biotechnology, inc)

3.1.4 Equipos

- Horno secador marca Grander. MTN. Modelo CD-160
- Molino marca IKA. Modelo: M 20 S003
- Rotoevaporador. IKA (RV 8 V-C)
- pH metro. Mettler Toledo
- Centrífuga. Rotina 380
- Balanza de humedad. Citizen MB 200
- Buchi Mini Spray Dryer. B-290
- Espectrofotómetro DR-5000 UV-Vis. Hach
- Espectrofotómetro infrarrojo. JASCO FT/IR-4100

- Incubadora de laboratorio de CO_2. Panasonic
- Espectrofotómetro lector de microplacas. PerkinElmer Víctor X3
- Microscópio Optico invertido
- Microscopio de fluorescencia Leica-DMi8. Leica Microsystems, Alemania
- Cámara de cultivo celular Thermo Scientific. Modelo 1300 series A2

3.2 Métodos

3.2.1 Obtención de harina de papa morada

Las papas nativas (*Solanum spp*.), tanto de la variedad Puca-shungo como Yana-shungo se compraron en el Consorcio de Productores de Papa de la Región Central del Ecuador (CONPAPA), ubicado en la Provincia de Tungurahua Cantón Ambato sector Mayorista Av. El Cóndor, luego se llevaron al laboratorio de la FCIAL-UODIDE en donde se lavaron y quitaron todas las impurezas, seguidamente se secaron y cortaron en forma de hojuelas para facilitar el proceso de secado, el mismo que duró 24 horas a una temperatura de 126 °F (52,2 °C) en un horno secador marca Grander. MTN. Modelo CD-160. Posteriormente las hojuelas secas se pulverizaron en un molino marca IKA. Modelo: M 20 S003, finalmente se pasó por un tamiz obteniendo así la harina de cada una de las variedades de papa a estudiar.

3.2.2 Extracción de antocianinas de papa morada

La extracción de antocianinas de cada una de las variedades se realizó por distintos métodos que se detallan a continuación.

Método 1. Fan, Han, Gu, & Chen (2008), optimizaron las condiciones para la extracción de antocianinas de la batata morada utilizando la metodología de superficie de respuesta, tomando en cuenta variables como tiempo de extracción 60 minutos, temperatura 70 º C, relación sólido-líquido y solvente etanol- HCl (1,5mol/l).

Para la determinación se usó la siguiente fórmula:

$$\boldsymbol{Total\ ant = A_{530} X \frac{F.D}{98.2}}$$

Donde:

$$A_{530} = Absorbancia\ obtenida\ del\ extracto$$
$$FD = Factor\ de\ dilución$$
$$98.2 = Absortividad\ molar\ ácido - etanol$$

Método2. Giusti & Wrolstad, (2001), realizaron caracterización y medición de antocianinas mediante espectroscopia UV-Visible, con las siguientes variables: Etanol al 20% acidificado (pH 2) en una relación de 1:80 (M/V), temperatura de extracción 90 ºC por 60 minutos.

Se determinó la cantidad de antocianinas por medio del método de pH diferencial.

$$\boldsymbol{A = (A_{520} - A_{700})pH1,0 - (A_{520-}A_{700})pH4,5}$$

Donde:
A: Absorbancias a distintas longitudes de onda
Para determinar antocianinas monoméricas

$$\boldsymbol{MA = \frac{AxMxDFx100}{\varepsilon x1}}$$

Donde:
$MA: Antocianinas\ monoméricas$
$A: Absorbancia\ resultante$
M: *Peso molecular de cianidina 3-glucósido (449g/mol)*
$DF: Factor\ de\ dilución$
$A: Absorbancia\ resultante$
$\varepsilon: Coeficiente\ de\ extinsión\ molar$
$(26900 L.mol^{`-1}.cm^{-1})$

Método 3. Otro método utilizado fue el descrito por Abdel-Aal & Hucl, (1999), donde se utilizó como solvente HCl (1N), relación etanol-HCl 85:15, relación muestra solvente 1:20, pH= 1, relación sólido líquido (1:8), temperatura de extracción 60 º C, tiempo de extracción 15 minutos con agitación.

La cantidad de antocianinas obtenidas se determinó por:

$$\boldsymbol{C = \frac{A}{\varepsilon} x \frac{vol}{1000} xMWx \frac{1}{sample\ wt} x10^6}$$

Donde:
C: Es la concentración de antocianinas mg/kg, en nuestro caso se dividirá sobre 10 para obtener el resultado en mg/100g
A: Es la absorbancia obtenida a535nm
ε: Absortividad molar (cyanidina 3-glucósido 25965 cm^{-1} M^{-1})
Vol: Volumen total del extracto de antocianinas
MW: Peso molecular de cianidina 3-glucósido (449)

Para la extracción de antocianinas de papa morada se usó el método de (Abdel-Aal & Hucl, 1999) tomando los mejores parámetros de su experimentación y complementándolo con otras modificaciones. Una vez obtenida la harina de papa morada tanto de la variedad Yana-shungo como Puca-shungo se pesaron 100 g para mezclarlo con el disolvente (etanol: HCl 1mol/l; relación 85:15), manteniendo la relación 1:20 es decir 100 g de harina por cada 2000 ml del disolvente, posteriormente se midió el pH y se lo ajustó con HCl 4 mol/l hasta llegar 1, a continuación se colocó la solución en un reactor (4 l) de acero inoxidable con tapa para evitar que se evapore, además se agitó durante 60 minutos a temperatura de 68 °C, seguidamente se centrifugó durante 15 minutos a 15000 rpm, luego se recogió el sobrenadante. El disolvente se eliminó con un rotaevaporador IKA (RV 8 V-C) a una temperatura de 75 °C, al final se midió el volumen obtenido de concentrado de antocianinas y se guardó en refrigeración a 4 °C en un frasco de vidrio ámbar para protegerlo de la luz y evitar que se descompongan las antocianinas.

3.2.3 Determinación de antocianinas de papa morada

Una vez obtenido el extracto líquido de las papas moradas se deberá determinar la concentración de antocianinas según (Abdel-Aal & Hucl, 1999) se debe medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 535nm.

3.2.4 Microencapsulación de antocianinas mediante Spray-dryer

3.2.4.1 Preparación de la disolución para el proceso de secado

Al concentrado de antocianinas de papa morada se le midió la cantidad de sólidos totales por dos métodos: Método 2540-B (diferencia de peso por secado) y por método gravimétrico balanza de humedad (Citizen MB 200), lo cual dio un valor promedio de 27,7 %, con este dato se calculó la cantidad necesaria de cada uno de los componentes de la solución (concentrado de antocianinas=72 ml, maltodextrina=80 g, agua=282 ml), posteriormente se mezcló con agitación constante a una temperatura de 45 °C para que la maltodextrina se disolviera de mejor manera.

3.2.4.2 Uso del equipo de secado Buchi Mini Spray Dryer. B-290

La microencapsulación de antocianinas de papa morada se realizó en la UTA-FCIAL-UODIDE en un equipo Buchi Mini Spray Dryer. B-290. Primero se conectó el equipo a un interruptor de 110V, se encendió el compresor de aire y el equipo, además se verificó que la presión sea la adecuada (-50 mbar), una vez realizados estos pasos se pulso el botón ASPIRATOR, después se encendió la TEMPERATURA DE ENTRADA y se ingresó la temperatura deseada para el proceso de secado (150 °C), cuando alcanzó dicha temperatura se abrió el flujo de aire y de agua (PUMP) para controlar la TEMPERATURA DE SALIDA (90 °C), seguidamente con la disolución (concentrado de antocianina, polímero encapsulante (maltodextrina), agua) preparada y los parámetros listos se procedió a realizar el secado, cuando el proceso finalizó se apagó la temperatura de entrada y se dejó pasar agua hasta que la temperatura indique 100 °C, luego se cerró el flujo de agua y el de aire en el orden indicado. Cuando la temperatura descendió a 70 °C se desmontó el equipo y se recuperaron las antocianinas microencapsuladas

3.2.5 Espectrofotometría Infrarroja FT-IR

Obtenido el microencapsulado de antocianinas de papa morada se efectuó el análisis del espectro infrarrojo, en la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo ESPOCH Facultad de Ciencias, Laboratorio de Química Instrumental.

Se conectó el equipo y el ordenador al tomacorriente de 110 V, luego se encendió el equipo presionando el switch POWER ubicado en la parte superior derecha del equipo y se esperó 5 minutos hasta que los parámetros de análisis estén listos, para el inicio el barrido se encendió el ordenador para ubicarse en: Inicio/Todos los programas/JASCO/Spectra Manager, posteriormente se corrió el programa Spectra Manager y Quick-Start, a continuación se limpió con algodón y alcohol el área de la muestra (Cristal de seleniuro de zinc, soporte y capuchón de tornillo) ubicada en la parte interior central del equipo, luego se realizó el Background para verificar la ausencia de sustancias en el área de muestra presionando el botón Strart ubicado en la parte frontal del equipo. Tanto para el análisis de muestras sólidas como líquidas se colocaron sobre el cristal del área de muestra, luego se quitó el seguro ubicado en la

parte posterior, seguidamente se jaló hacia adelante el tornillo de ajuste. Se ajustó hasta que muestre fricción, se cerró la tapa y pulsó Strart, al momento de procesar y corregir las escalas se utilizó el programa Spectra Analysis el mismo que ayudó a identificar y etiquetar los picos más relevantes, entre otras opciones según lo que se necesite, una vez realizado este proceso se guardó el espectro y como paso final se abrió la tapay se limpió con algodón y alcohol como se indicó anteriormente.

3.2.6 Evaluación citotóxica y proapoptotica

Para realizar los ensayos inmunocitoquímicos, se utilizaron células HeLa (ATCC®CCL-2 ™) que derivan de un linaje de una muestra de cáncer cérvico-uterino infectadas con el HPV18, las cuales fueron donadas por la Dra. Mileidys Pérez Alea del Grupo de investigación de Modelos Animales y Cáncer de la Fundación Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España.

3.2.6.1 Descongelamiento de células

Las células HeLa estuvieron almacenadas y conservadas en un tanque con nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C en un tubo criovial que contenía la suspensión celular con medio de criogenlación (90 % suero fetal bovino (FBS) y 10 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) el cual evita que se formen cristales en la célula.

El medio de cultivo celular empleado fue DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 1X (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10%, L-glutamina 1 %, penicilina y estreptomicina (P/S), 1 %, suero fetal bovino (FBS). Se colocó en baño maría hasta que alcance una temperatura de 37 °C, seguidamente se procedió a sacar el vial del tanque de nitrógeno para colocarlo en baño maría durante un minuto aproximadamente sin dejar que se descongelara por completo, con una micropipeta se agregó 1ml de medio DMEM al criovial que contenía las células, para descongelar totalmente y agregarlo a un tubo falcon con 5ml de medio, a continuación se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1ml del medio de cultivo. Para la incubación se utilizaron frascas de 75 cm^3 (Thermo Fisher Scientific), a las cuales se agregaron 10ml de medio de cultivo

DMEM 1X junto con la suspensión de células, y se procedió a incubar a 37 °C con 5 % CO_2 y atmosfera húmeda durante 24 horas.

3.2.6.2 Ensayo del MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.
Una vez que las frascas tuvieron alta confluencia de células (>80 %) se procedió a realizar el conteo celular utilizando una cámara de Neubauer, en la cual se emplea una suspensión de células en medio de cultivo DMEM 1X disgregadas con la ayuda de una jeringa estéril, a continuación se tomó un volumen de 30 µL de la suspensión celular con 30 µL de Trypan Blue (Sigma-Aldrich), que permitió visualizar la proporción de células vivas (las que no se tiñen), frente a las muertas (teñidas de azul). En la cámara de Neubauer se colocaron 10 µL (solución celular + Trypan Blue) y se procedió a realizar el conteo en un microscopio óptico con un aumento de 40X, se realizaron los cálculos con el propósito de conocer el volumen necesario para colocar 10 000 células en cada pocillo.

En placas de 96 pozos se sembraron 10 000 células en cada pocillo, se incubaron a 37 º C y 5 % de CO_2 durante 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente se descartó el medio de cultivo y se colocaron los tratamientos del microencapsulado de antocianinas de papa morada (diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-11} mg/ml) durante 24 horas, transcurrido este tiempo los tratamientos fueron descartados para adicionar 100 µL de medio sin suero, ni rojo fenol por pozo, junto con 10 µL de MTT (mg/ml) en solución tampón libre de calcio y magnesio, se incubó por 4 horas a 37 ºC para permitir la formación de cristales de formazán, sobre esta solución se adicionó SDS (dodecilsulfato sódico) (1mg/ml disuelto en HCl 0,01 mol/l) durante 4 horas para disolver los cristales formados (Barone et al., 2017; Castro, 2006). Como paso final se leyó la placa en un espectrofotómetro lector de microplacas (PerkinElmer Víctor X3)

a una longitud de onda de 570 nm. Siendo la absorbancia obtenida proporcional al número de células vivas o proliferación de celular.
El análisis estadístico de los datos para la obtención del IC 50 se realizó en el software GraphPad Prism versión 7.04.

3.2.6.3 Ensayos inmunocitoquímicos

En placas de 6 pocillos se colocó un cubreobjetos estéril en cada uno de los pozos con 500.000 células durante 48 horas, transcurrido este tiempo se eliminó el medio de las placas, se lavó con PBS y se agregaron los tratamientos a cada uno de los pocillos a una concentración determinada con el IC 50 obtenido en el ensayo del MTT, y se incubó durante 24 horas.
Para el proceso de fijación, las células HeLa se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS y posteriormente se le adicionó 1 ml de paraformaldheido al 4 % durante 15 minutos, seguidamente se lavaron con PBS y se procedió a realizar el proceso de permeabilización, colocando 1ml de buffer de permeabilidad que contiene 20 mM glicina 0.5Triton X100 por 15 minutos en agitación, se lavaron las placas con PBS 3 veces cada 5 minutos.

Para el marcaje de Bax, BCl2 y Caspasa 8, se realizó la técnica de inmunocitoquímica empleando los anticuerpos: Bax Antibody (6A7) sc-23959, Bcl-2 Anticuerpo (7) sc-130308, caspase-8 Anticuerpo conjugado (8CSP03) sc-56070 (Santa Cruz Biotechnology, inc), respectivamente previa dilución 1:500. Para la localización de Bax, se utilizó el anticuerpo secundario de unión a IgG kappa de ratón conjugada a fluoresceina (FITC) (m-IgGκ BP-FITC Santa Cruz Biotechnology, inc), mientras que para BCl2 se empleó la proteína de unión a IgG kappa de ratón conjugada a ficoeritrina (PE) (m-IgGκ BP-PE Santa Cruz Biotechnology, inc) los cuales se diluyeron previamente 1:500 y se incubaron a 37 °C durante media hora en cámara húmeda, se lavaron con PBS y posteriormente los covers fueron montados sobre láminas portaobjetos con Aqueous Mounting (Ultra Cruz). Para la visualización se empleó un microscopio de fluorescencia Leica-DMi8 (Leica Microsystems, Alemania), empleando los filtros GFP (500-550 nm), DAPI (358-461nm) Texa Red (595- 615 nm) con una magnificación de 630X.

Las imágenes microscópicas se capturaron en fotografías digitales a través del software Leica Application Suite (LAS) X que permite el análisis de imágenes, además de la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia (positividad) por medio de un valor obtenido de la relación de pixeles totales de la fotografía y los pixeles del área considerada como positiva.

3.3 Diseño Experimental

Para encontrar el mejor tratamiento en el proceso de extracción de antocianinas de papas nativas coloreadas se empleó un diseño experimental 3^2 y los resultados se analizaron con el programa Statgraphics centurión XV versión 15.2.05 2007.

Para el análisis estadístico de los ensayos citotóxicos e inmunocitoquímicos se usó el software Instat GraphPad Prism 7.04, los resultados se presentaron como gráficos tomando en cuenta medias y desviaciones estándar (DS), se realizó análisis de varianza ANOVA con post test de Tukey para el análisis comparativo entre el número de células positivas e intensidad de expresión de las proteínas involucradas en el proceso de apoptosis incluyendo células control y células tratadas. Se tomó como índice de confianza el 95% y se consideró significativos valores de $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

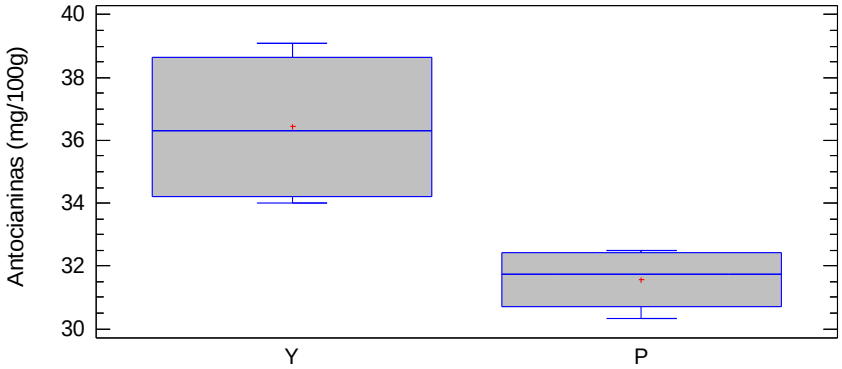


Figura 4. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método 1 propuesto por (Fan et al., 2008)

La figura 4 muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0{,}005$) entre las variedades de papa Yana-shungo (Y) y Puca-shungo (P). Además, se puede notar que no existe homogeneidad entre las variedades. Yana-shungo presentó un valor medio de concentración de antocianinas de 36,43 mg/100g y Puca-shungo 31,57 mg/100g.

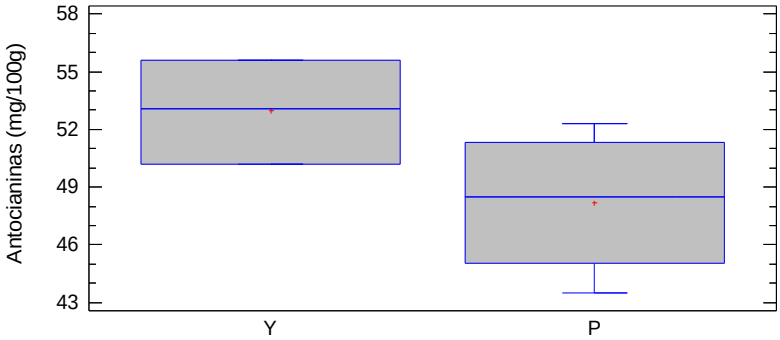


Figura 5. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método 2 propuesto por (Giusti & Wrolstad, 2001)

La figura 5 muestra que no existe diferencia significativa (p=0,1338) entre las dos variedades de papa. Se observa homogeneidad entre los grupos, como indica la gráfica de bloques que cada uno tiende a sobreponerse, no existe mayor diferencia entre las concentraciones obtenidas de antocianinas, pese a esto Yana-shungo obtuvo un mayor contenido promedio de antocianinas 52,97 mg/100g en relación a la variedad Pucashungo 48,2 mg/100g. El método dos resultó tener mayor concentración de antocianinas que el método uno.

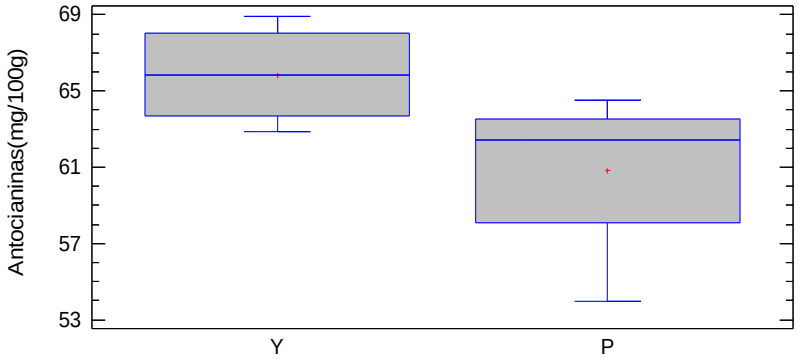


Figura 6. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Abdel-Aal & Hucl, 1999)

Al igual que en los casos anteriores la figura 6 con el método 3 descrito por (Abdel-Aal & Hucl, 1999), no existe diferencia estadísticamente significativa (p=0,1124) entre las variedades Y y P. Se obtuvieron 60,83 mg/100g para la variedad Puca-shungo, y 65,85 mg/100g para Yana-shungo. Cabe destacar que este método es el que mayor contenido de antocianinas extrae.

La variedad de papa Yana-shungo es la que mayor contenido de antocianinas posee, lo que se justifica debido al color morado que posee es mucho más intenso que el color rojo de la variedad Puca-shungo ya a que a medida que el color es más oscuro posee mayor contenido de antocianinas.

Según Monteros et al., (2011), Yanashungo posee 98-385mg/100g y Pucacshungo 189-230mg/100g de polifenoles dentro de los que se encuentran las antocianinas.

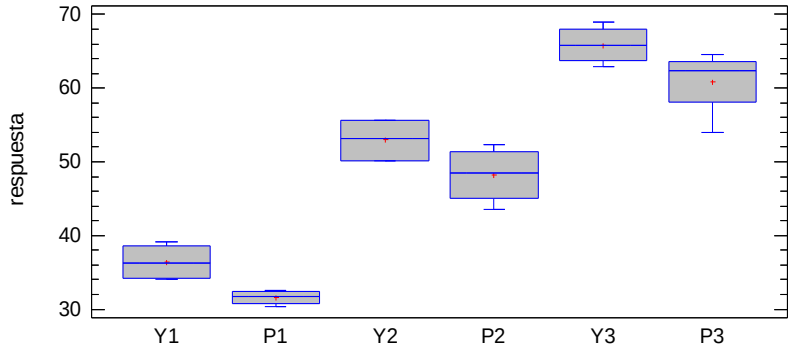


Figura 7. Comparación de los tres métodos utilizados en la extracción de antocianinas.

En la figura 7 se observan los 3 métodos utilizados y cada una de las variedades de papa representadas por Y y P. En todos los casos se nota que la variedad Yana-shungo posee mayor contenido de antocianinas. No existe diferencia significativa entre el método 2 y 3. Por medio del método 3 se extrae una mayor cantidad de antocianinas en las dos variedades de papa.

Los tres métodos utilizados para la extracción de antocianinas en la cual todos los autores toman en cuenta tres variables : relación extracto-solvente, temperatura, y tiempo de extracción, coinciden en realizar una solución alcohol-con una mínima cantidad de ácido, según Aguilera Ortíz M et al., (2011) en un medio ácido se obtiene la forma del catión flavilio el cual es estable en medio altanamente ácido, además se puede observar que el rango de temperatura varía entre (60 y 90 ºC).

Tanto el método 2 y 3 comparten similitudes de acuerdo al uso de sus variables, ya que utilizan como solvente etanol acidificado con el propósito de llegar a valores de pH bajos (1-2). Además, no existe mayor diferencia tanto en la extracción de cada variedad de papa como en la comparación de los métodos.

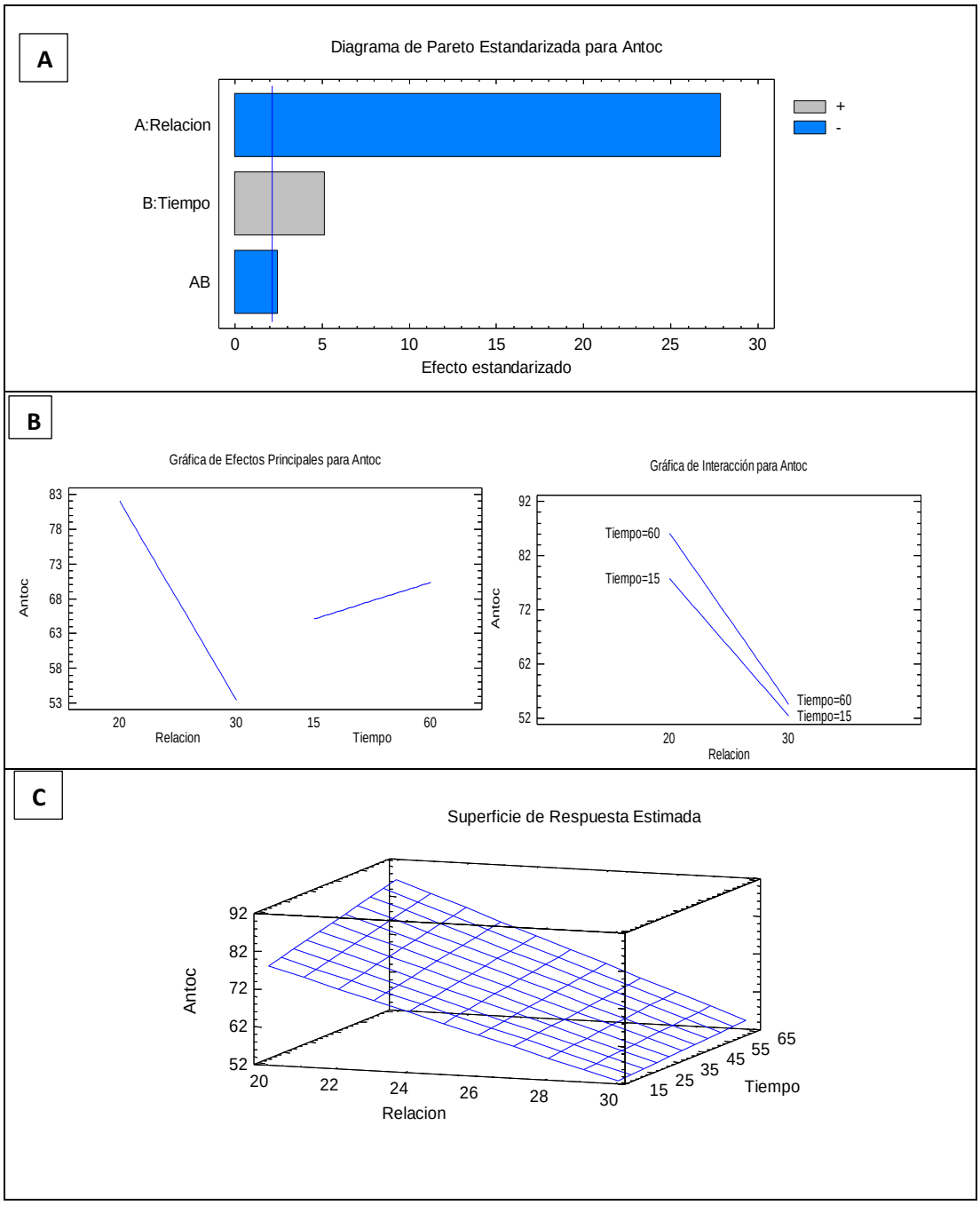


Figura 8. Resultados del diseño experimental con los parámetros optimizados para la extracción de antocianinas de papa variedad Yana-shungo

En la figura 8 se muestra el análisis estadístico de los resultados del diseño experimental del estudio de las condiciones del proceso de extracción de antocianinas de papa morada variedad Yana-shungo. (A) en el diagrama de Pareto se observa que tanto la relación, tiempo y la interacción de estos factores tienen una influencia significativa ($p \leq 0{,}005$) sobre el contenido de antocianinas, se obtuvo un modelo con un ajuste (r^2 =98,43%). En el gráfico de efectos (B) se muestra que se alcanza una mayor concentración de antocianinas para la relación 1:20 y para un tiempo de 60

minutos, lo cual se observa también en el gráfico de interacciones donde se muestra que a una relación 1:20 y un tiempo de 60 minutos se obtiene la máxima concentración de antocianinas 87,5 mg/100g, de igual forma se manifiesta esta respuesta de una forma más explícita en el diagrama de superficie de respuesta (C) donde se puede observar nuevamente que la relación 1:20 y tiempo 60 minutos son los mejores parámetros para la extracción de antocianinas.

Los valores de la tabla 5 fueron obtenidos luego del secado y pulverizado de papa nativa morada Yana-shungo, cabe resaltar que las papas se utilizaron con cascara. Se midió la humedad de la harina y se calcularon los valores tanto de solvente como de harina de papa para conservar la relación (1:20), adicionalmente una vez obtenido el extracto se muestra el volumen final del concentrado y el % de sólidos totales.

Tabla 5 Datos de harina y concentrado de antocianinas

Parámetros	Valor
% humedad de harina	9
Masa harina (g)	200
Volumen solvente (Et-OH-HCl,1,5 mol/l) (ml)	4000
Volumen de extracto de antocianinas (ml)	800
Volumen concentrado de antocianinas (ml)	120
% sólidos totales en el concentrado	28

Microencapsulación de antocianinas

El extracto obtenido con las condiciones óptimas se evaporó disolvente a 70°C hasta tratar de reducir 6 veces su volumen, para obtener una mayor estabilidad se debe realizar una concentración adicional para tener un efecto de estabilización, dado que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemicetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio, protegiendo la molécula de antocianina (Ekici, Simsek, & Ozturk, 2013; Mohajer, 2014). El concentrado con un contenido de 28% de sólidos, se microencapsuló empleando como polímero la maltodextrina de bajo equivalente de dextrosa (DE10) mediante secado por aspersión.

Las antocianinas microencapsuladas tuvieron un rendimiento de 82,05% debido a que parte del producto se retuvo en las paredes del equipo y no fue posible recuperar, la concentración final de antocianinas con los parámetros de extracción optimizados (relación 1:20, pH 1, temperatura de extracción 68 °C, tiempo de extracción 1 hora) fue de 168,5 mg/100g, ya que al principio en base al diseño experimental y sin realizar la optimización de los parámetros se obtuvo una concentración máxima de antocianinas de 87,5 mg/100g. Estudios realizados anteriormente muestran a continuación la concentración de antocianinas obtenidas: (Heras, Alvis, & Arrazola, 2013) extrajeron y micorencapsularon mediante secado por aspersión antocianinas de (*Solana melonera L.)* optimizando las condiciones de extracción con 50% de solvente acidificado, tiempo de proceso de 4 horas y temperatura de 30 °C, alcanzando una concentración de 62 mg/100g, Bermúdez et al., (2016) de igual manera extrajeron componentes antioxidantes de exocarpo del corozo (*Bactris guineensis L*.), utilizando como solvente etanol (96%) acidificado con ácido cítrico relación (19:1 v/p) en un tiempo de 24 horas y relación exocarpo: solvente 1:4), lo que dio como resultado una concentración de 124,9 mg/100g. Además Fan et al., (2008) optimizaron el proceso de extracción de antocianinas del camote morado ,los resultados mostraron que la producción más alta (158 g mg/100 dw) fue alcanzada en la temperatura 80 °C, el tiempo de extracción 60 minutos, y la proporción sólido-líquido 1:32.

Diez Morales., *et al*, (2013)**,** realizaron un estudio acerca de la cuantificación de los principios anticancerígenos de la variedad de papa nativa de pulpa de color de la región la Libertad (Perú) con el fin de procesamiento industrial. En una variedad de papa morada no especificada obtuvieron un valor de antocianinas de 138,67 mg/100g a una absorbancia de 545nm (MALVIDINA) y 163,24 mg/100g (PELARGONIDINA) a 515nm.

Análisis de Espectroscopia Infrarroja

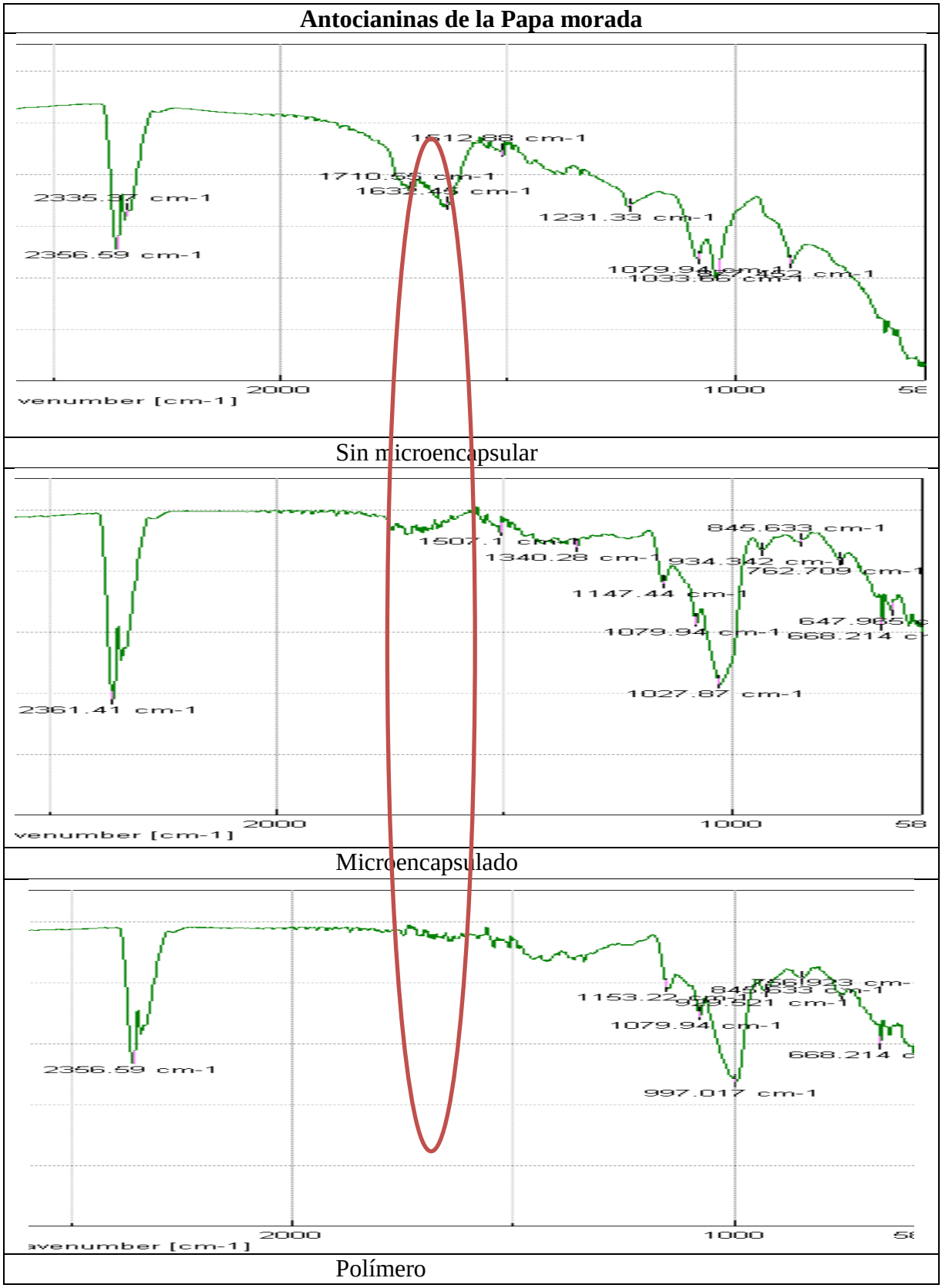


Figura 9. Espectros de FTIR del producto microencapsulado en comparación con el producto sin microencapsular y el polímero utilizado.

A un rango espectral de 4000 cm-1 a 580 cm-1, fue analizado concentrado de antocianinas sin encapsular, microencapsulado y polímero. Los espectros infrarrojos obtenidos (Figura 9) muestran que las antocianinas microencapsuladas y el polímero carecen de las bandas presentes en el espectro de las antocianinas sin microencapsular. Dichas bandas corresponden a los grupos OH de los polifenoles (1710-1512 cm^{-1}) (Shurvell, 2006). Lo que demuestra que las antocianinas están encapsuladas.

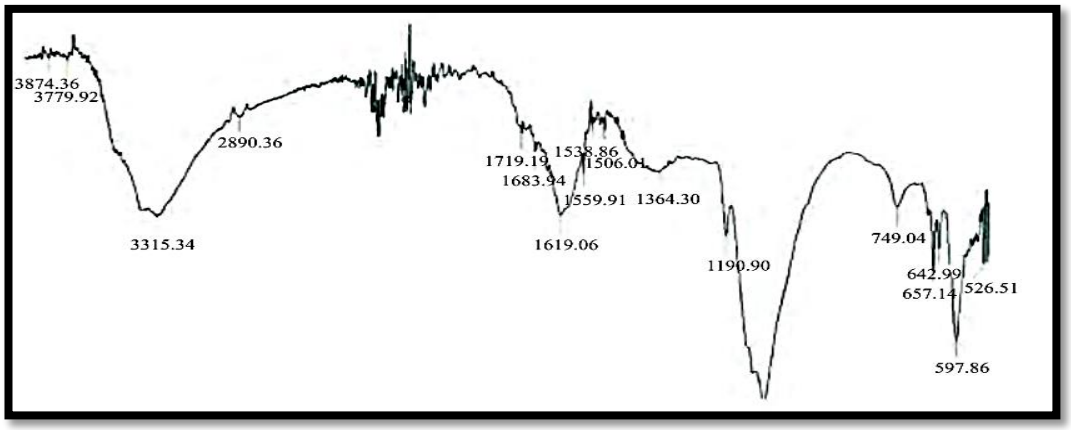


Figura 10. FTIR de compuestos antociánicos presentes en hierba santa (*Cestrum hediondinum D.*)

En la figura 10 se puede observar y comparar los espectros de las antocianinas obtenidos. Tanto en el estudio de la hierba santa como con el espectro de la antocianina de la papa morada sin microencapsular (8A). Se nota que las dos figuras tienen picos muy parecidos en el rango que corresponde a los grupos OH de los polifenoles (1710-1512 cm^{-1}). Esto confirma que los compuestos microencapsulados son polifenoles que pertenecen a estructuras de antocianinas de la papa morada.

Juárez Montiel et al., (2013), igualmente realizaron espectroscopía infrarroja (IR) de compuestos antociánicos presentes en el colorante de la hierba santa (*Cestrum hediondinum D.*). Mencionan que es importante en este tipo de reacción donde las antocianinas son los monómeros, que el pH sea ácido para evitar la degradación de la antocianina por apertura del anillo C hacia la formación de chalcona con pérdida irreversible de sus propiedades. Un pH de 3 a 4 en la reacción permite tener a la molécula de antocianina al estado de ion flavilio en equilibrio con la pseudobase carbinol.

Se puede concluir que, por la importancia de las antocianinas por sus aplicaciones, los resultados obtenidos apuntan a que se debería elaborar un proyecto donde se obtengan estas de diferentes fuentes y se evalúe comparativamente sus actividades biológicas.

Ensayos de citotoxicidad

Microencapsulado de antocianina a pH 1,42 **Microencapsulado de antocianina a pH 3,43**

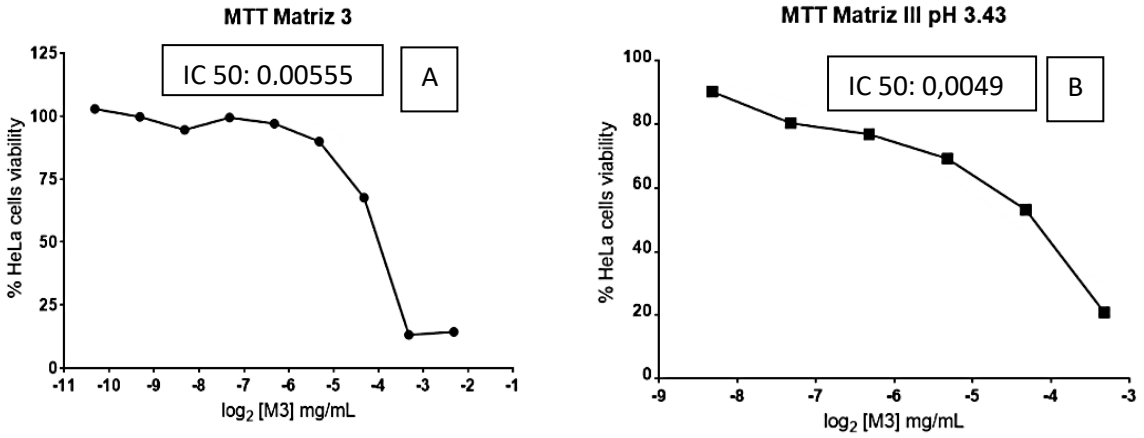


Figura 11. Porcentajes de viabilidad celular según el método de MTT en células HeLa, tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de antocianinas de papa morada variedad Yana-shungo, a las 24 h de incubación

En la figura 11 (A), con el microencapsulado antocianinas a pH 1,42 se graficó el $\log_2$ de la concentración de microencapsulado de antocianinas de papa morada a partir de un stock de 1mg/ml, el cual se obtuvo disolviendo 2,967g en 5 ml de PBS, seguidamente se realizaron diluciones seriadas y se obtuvo un valor de la mitad de la concentración máxima inhibitoria IC 50=0,0055mg/ml. Para **(B)** se ajustó el pH del microencapsulado de antocianinas de papa morada con NaOH 1 mol/l (1,35 ml) hasta llegar a un pH de 3,43 y el valor de (IC 50) fue 0,0049mg/ml.

Estos resultados coinciden con lo manifestado por Persi, Rinaldini, Carrión, Hapon, & Gamarra-Luques, (2017), evaluaron las propiedades citotóxicas y antitumorales del extracto acuoso de Tessaria absinthioides (*Hook & Arn*) DC, “pájaro bobo”. El extracto obtenido tuvo una alta cantidad de flavonoides grupo al cual también pertenecen las antocianinas, por lo que fue posible realizar la comparación de los ensayos citotóxicos. La citotoxicidad se estudió en líneas celulares tumorales (Gli-37,

HeLa, HCT-116 y MCF-7). En dicho estudio se obtuvieron valores de IC 50 entre 0,003mg/ml-0,0148mg/ml, lo que muestra que los valores de IC 50 del extracto de antocianinas de papa morada se encuentra dentro del mismo rango.

De igual manera Ashraf et al., (2015), obtuvieron un valor de IC 50= 0,5988mg/ml al realizar el análisis citotóxico del extracto de hexano de *E. royleana* fresca por medio de la prueba de letalidad del camarón de salmuera. Mohajer, (2014) trabajó con un extracto etánolico de antocianinas de la planta *Celosia Cristata* en la línea celular HCT116. Obtuvo un IC50 de 0,02 mg/ml. Este valor es mucho mayor que los valores de IC 50 obtenidos del concentrado de antocianinas de papa morada.

Los concentrados de antocianinas de papa morada variedad Yana-shungo utilizados en el ensayo de MTT tuvieron actividad antiproliferativa en células HeLa. Los valores de IC 50 obtenidos (0,0052 mg/ml y 0,0049 mg/ml) tanto para el extracto a pH 1,42 y pH 3,43, presentan una alta toxicidad. El IC 50 tiene una relación inversamente proporcional, es decir, a medida que el valor de IC 50 es mayor la actividad citotóxica disminuye.

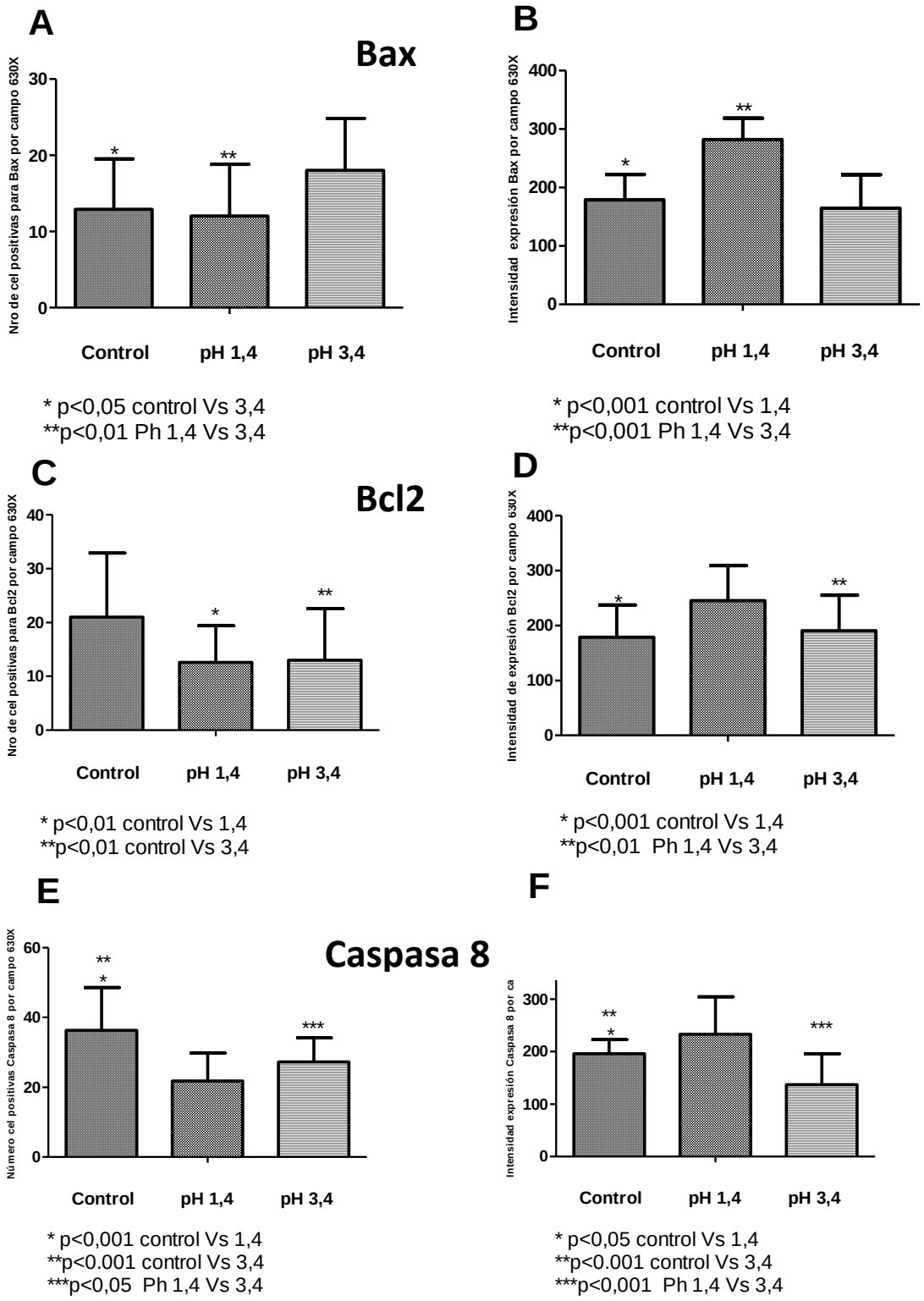


Figura 12. Expresión de Bax, Bcl2 y Caspasa 8 en células HeLa tratadas con microencapsulado de antocianinas de papa morada (Solanum andígena) a pH 1,42 y pH 3,43 de acuerdo al número de células positivas por campo e intensidad empleando filtros GFP (488- 510nm) y DAPI (461-500nm) con una magnificación 630X

En la figura 12 se presenta la expresión de la proteína pro-apoptotica Bax, para el número de células positivas por campo **(A)**, en donde se encontraron diferencias estadísticas significativas entre control y pH 3,4 ($p<0,05$) y entre pH1,4 vs pH3,4 ($p<0,01$), de igual forma en la intensidad de expresión por campo **(B)**, se observó una diferencia altamente significativa ($p<0,001$) en dos casos: control vs pH1,4 y pH 1,4 vs pH 3,4. **(C)** y **(D)** muestran resultados de Bcl2 de acuerdo al número y expresión respectivamente **(C)** presentó diferencias significativas en dos casos control vs pH1,4 ($p<0,01$) y control vs pH3,4($p<0,01$), mientras que **(D)** obtuvo un valor estadístico ($p<0,001$) en relación a la intensidad de expresión por campo entre el control y pH1,4 y ($p<0,01$) pH1,4 vs pH3,4 En cuanto al patrón de expresión de caspasa 8 **(E)** se encontró una alta significancia ($p<0,001$) entre el control vs pH 1,4 y control vs pH3,4, mientras que los tratamientos pH1,4 y pH3,4 se diferenciaron significativamente ($p<0,05$) de acuerdo al número de células positivas. Finalmente **(F)** muestra la intensidad de expresión con una diferencia significativa ($p<0,05$) entre control y pH 1,4, evidenciándose además un valor de ($p<0,001$) entre control vs pH1,4 y pH 1,4 vs pH 3,4. Estos resultados muestran un incremento en la expresión de proteínas involucradas en la apoptosis en células sometidas a tratamiento con el microencapsulado de antocianina de papa morada.

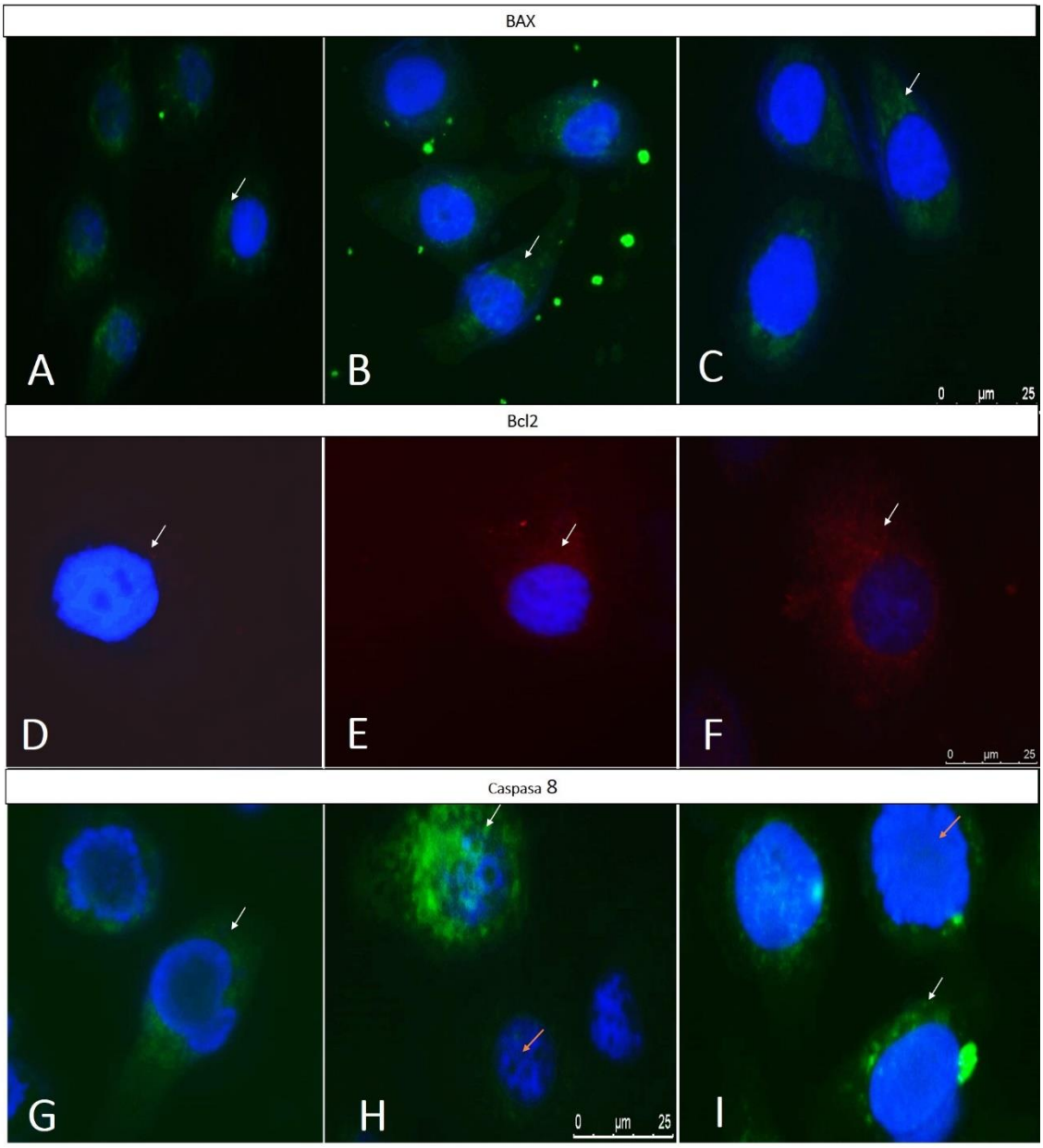


Figura 13. Expresión de Bax, Bcl2 y Caspasa 8 en células HeLa tratadas con microencapsulado de antocianinas de papa morada.

Las flechas marcadas con color blanco indican expresión de cada uno de los ensayos y las flechas rojas muestran núcleos apoptóticos resultado de los tratamientos.

La expresión de proteína pro-apototica Bax y proteína anti-apoptotica Bcl2 muestra que se dio un proceso de apoptosis desregulado ya que según Sosa, (2012), cuando hay disrupción en el balance de miembros de la familia Bcl-2 anti-apoptóticos y pro-apoptóticos, el resultado es una apoptosis desregulada en las células afectadas. Esto puede deberse a una sobreexpresión de una o más proteínas anti-apoptóticas o a una

sub-expresión de una o más proteínas pro- apoptóticas o a una combinación de ambas cosas, la sobreexpresión de Bcl-2 (anti-apoptótica) protege a las células del cáncer de próstata de la apoptosis; también se demostró que la sobreexpresión de Bcl-2 lleva a la inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL en los neuroblastomas y en las células de cáncer de mama.

El microencapsulado de antocianas de papa Yana-shungo posee alta actividad apoptótica en células HeLa lo cual es beneficioso ya que por medio del proceso de apoptosis se eliminan células dañadas sin causar ningún tipo de inflamación o alteración del medio en donde se encuentran, es decir no van a afectar a células vecinas que sean viables. A mediano o largo plazo las antocianinas pueden ayudar en el tratamiento de varios tipos de cáncer.

4.2 Verificación de las hipótesis

4.2.1 Estudio del contenido de antocianinas de las papas nativas coloreadas Puca-shungo y Yana-shungo

Hipótesis Nula

La variedad de papa nativa Yana-hungo no posee mayor contenido de antocianinas que la variedad Puca-shungo

Hipótesis Alternativa

La variedad de papa nativa coloreada Yana-shungo posee mayor contenido de antocianinas que la variedad Puca-shungo

En todos los casos la variedad Yana-shungo obtuvo una mayor cantidad de antocianinas por lo que se acepta la hipótesis alternativa. La variedad de papa nativa coloreada Yana-shungo posee mayor contenido de antocianinas que la variedad Puca-shungo

4.2.2 Evaluación del efecto de la temperatura y tiempo en el proceso de extracción de antocianinas

Hipótesis Nula

La variación de la temperatura, relación y el tiempo en el proceso de extracción de antocianinas no afectan su concentración

Hipótesis Alternativa

La variación de la temperatura, relación y el tiempo en el proceso de extracción de antocianinas afectan su concentración

Se verifica la hipótesis alternativa la variación de la temperatura, relación y el tiempo en el proceso de extracción de antocianinas afectan de forma positiva la concentración de antocianinas, ya que a un mayor tiempo de extracción (60 minutos), temperatura de (68°C). El disolvente etanol-HCl relación 85:15 alcanza su punto de ebullición a 68±1 °C. Relación sólido-líquido (1:20), se obtuvieron los mejores resultados de concentración de antocianinas

4.2.3 Efecto citotóxico y actividad proapoptotica de la microcapsulas de antocianinas de papa morada mediante ensayos de MTT utilizando células HeLa infectadas con HPV18

Hipótesis Nula

Las microcápsulas de antocianinas de papa morada no tienen ningún efecto citotóxico ni actividad proapoptotica sobre células HeLa infectadas con HPV18.

Hipótesis Alternativa

Las microcápsulas de antocianinas de papa morada tienen efecto citotóxico y actividad proapoptotica sobre células HeLa infectadas con HPV18.

Se acepta la hipótesis alternativa las microcápsulas de antocianinas de papa morada si tienen efecto citotóxico y actividad proapoptotica sobre células HeLa infectadas con HPV18.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se extrajeron antocianinas de papa morada de dos variedades nativas del Ecuador Puca-shungo y Yana-shungo, posteriormente se microencapsuló para proteger de factores ambientales, físiscos, químicos y biológicos, además se probó la actividad pro-apoptotica en células HeLa (ATCC®CCL-2 ™). Los resultados obtenidos pueden ayudar a revalorizar varias especies de plantas nativas del Ecuador ya que sus metabolitos secundarios pueden ayudar en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades.
- Yanashungo fue la variedad de papa con mayor contenido de antocianinas. A medida que el color es más intenso la cantidad de antocianinas es mayor, tal como se diferenció en el estudio la variedad Yana-shungo posee un color violeta intenso. Esto se comprobó con la determinación de antocianinas de cada uno de los métodos analizados.
- Con las variables optimizadas se obtuvo una mayor concentración de antocianinas, se puede concluir que: a la relación (1:20) harina-solvente se extraen mayor cantidad antocianinas, el tiempo de igual manera influye de forma directa en el proceso de extracción ya que a mayor tiempo mayor es la cantidad de antocianinas presentes en el extracto, con respecto a la temperatura se trabajó a 67±0,5°C, ya que pasada esta temperatura el solvente se evapora.
- El microencapsulado de antocianinas tanto a pH 1,42 y pH 3,43 presentaron alta actividad antiproliferativa frente a células HeLa. Al comprobar la citotoxicidad de los compuestos de interés se puede concluir que existen nuevas moléculas de elevada biodisponibilidad con potencial actividad antitumoral que pueden ayudar en el tratamiento y control de células tumorales.
- Se evaluó la actividad apoptótica del microencapsulado de antocianinas mostrando en las imágenes de microscopia de fluorescencia células con núcleos apoptóticos característicos y condensación del material genómico en todos los ensayos (Bax, Bcl2 y caspasa 8).

5.2 Recomendaciones:

- Probar la factibilidad de reproducir el método de extracción de antocianinas de papa morada Yana-shungo a escala industrial y realizar caracterización morfológica de las microcápsulas.
- Realizar un estudio de estabilidad frente a factores ambientales del microencapsulado y del extracto durante un periodo largo de tiempo.
- Identificar cada uno de los componentes del microencapsulado por medio de una técnica de cromatografía.
- Estudiar la citotoxicidad y la actividad apoptótica del microencapsulado de antocianinas de papa morada Yana-shungo en otras líneas celulares.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdel-Aal, M., & Hucl, P. (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Journal of Cereal Chemistry*, *73*(C), 350–354.

Aguilera-Otíz, M., & Reza-Vargas, M. del C. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. Retrieved from http://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/81

Aguilera Ortíz M, Reza Vargas MC, Chew Madinaveitia RG, M. V. J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas Y de La Salud*, *XIII*, 16–22.

Angosto María Cascales. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Académica de Número de La Real Academia Nacional de Farmacia*, *69*(1), 36–64.

Ashraf, A., Sarfraz, R. A., Rashid, M. A., & Shahid, M. (2015). Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (Euphorbia royleana) from Pakistan. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*(1), 109–115. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.05.007

Ates, U., Gollu, G., Kucuk, G., Billur, D., Bingol-Kologlu, M., Yilmaz, Y., … Dindar, H. (2016). Incremento de la expresión de Bax (proapoptótico) y disminución de la expresión de Bcl-2 (antiapoptótico) en recién nacidos con enterocolitis necrosante. *Archivos Argentinos de Pediatria*, *114*(3), 243–247. https://doi.org/10.5546/aap.2016.243

Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., … de Keizer, P. L. J. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, *169*(1), 132–147.e16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031

Balmaceda, V. (2010). Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina. Comunicación. *Revista Argentina de Producción Animal*, *30*(1), 43–49.

Barone, D., Cito, L., Tommonaro, G., Abate, A. A., Penon, D., De Prisco, R., … Giordano, A. (2017). Antitumoral potential, antioxidant activity and carotenoid content of two Southern Italy tomato cultivars extracts: San Marzano and Corbarino. *Journal of Cellular Physiology*. https://doi.org/10.1002/jcp.25995

Bermúdez, M. F., Díaz-Moreno, C., & Fuenmayor, C. (2016). Evaluation of antioxidant components of ethanol extracts of the corozo exocarp (Bactris guineensis L .), (February 2017). https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.59928

Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, *9*, 25–33.

Castañeda Ovando A, Galán Vidal CA, Pacheco Hernández M de L, Rodríguez JA, P. H. M. (2009). Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas. *Journal Food*, (7: 225–232.).

Castro, C. (2006). PRUEBAS DE TAMIZAJE PARA DETERMINAR EFECTOS CITOTÓXICOS EN EXTRACTOS, FRACCIONES Ó SUSTANCIAS, UTILIZANDO LA PRUEBA DEL MTT. *Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, Colombia.*, (December), 1–11.

Cuichán, M., Salazar, D., Suárez, M., Villafuerte, W., Orbe, D., & Marquez, J. (2014). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC. *INEC*, *1*, 12. Retrieved from http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014-2015/2014/Informe ejecutivo ESPAC 2014.pdf

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

Diez Morales, C. A., López Medina, S. E., Zavaleta Salvatierra, C. R., Rodríguez Barrantes, M. Y., & Huayanay Viera, J. P. (2013). La Libertad Con El Fin De Procesamiento Industrial Quantification of Anti-Cancer Principles of Varieties Native Potatoe of Colored Pulp La Libertad Region To Industrial Processing, *24*, 425–431.

Ekici, L., Simsek, Z., & Ozturk, I. (2013). Effects of Temperature , Time , and pH on the Stability of Anthocyanin Extracts : Prediction of Total Anthocyanin Content Using Nonlinear Models. https://doi.org/10.1007/s12161-013-9753-y

Espinosa, M. B. (2014). Apoptosis, muerte celular fisiológica , reseña histórica y actualidad Apoptosis, Physiological Cell Death , Historical Review and Current Status Resumen, *16*, 153–159.

Esquivel-González B.E., O. M. L. A. . y R.-Q. O. M. (2015). Microencapsulación mediante secado… MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Esquivel---González B MICROENCAPSULATIONOFBIOACTIVECOMPOUNDSBYSPRAYDRYI NG. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, *16*(2), 180–192. Retrieved from http://www.redalyc.org/pdf/813/81343176006.pdf

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*(1), 155–160. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.019

FAO. (2008). El Año Internacional de la Papa 2008: Las papas, la nutrición y la alimentación. *Fao*, 2. Retrieved from http://www.potato2008.org/es/lapapa/IYP-6es.pdf

Flores-Balcázar, C.1 Rosales-Pérez, S.2 Caro-Sánchez, CHS.3 Gallardo-Alvarado, L.4 Gordillo-Bastidas, D. . (2015). Nutrientes de la Dieta y Apoptosis como Mecanismos Reguladores del Cáncer, *11*(12). https://doi.org/10.3823/1235

Garzón-Garzón, L.-P. (2016). Conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales de yarumo (Cecropia sciadophylla), carambolo (Averrhoa carambola) y uña de gato (Uncaria tomentosa) en el resguardo indígena de Macedonia, Amazonas. *Luna Azul*, *43*(43), 386–414. https://doi.org/10.17151/luaz.2016.43.17

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (August 2001), 0–13. https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00

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*. Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642013000500011&script=sci_arttext&tlng=pt

Hou, D. (2003). Potential Mechanisms Anthocyanins of Cancer Chemoprevention by, 149–159.

INIAP. (2010). Las papas nativas Ecuatorianas. Rescatando nuestra Biodiversidad..pdf.

INIAP, & CIP. (2002). El cultivo de la papa en Ecuador. *El Cultivo de La Papa En El Ecuador*, 231. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Juárez Montiel, Rossana Georgina; Pinto Apaza, Nilda; Cano de Terrones, T. (2013). Polimerización de compuestos antociánicos presentes en el colorante de la hierba santa (Cestrum hediondinum D.) y prueba de absorción de iones aluminio (III). *Rev Soc Quím Perú*, *79*(1), 71–79.

Kalušević, A., Lević, S., Čalija, B., Pantić, M., Belović, M., Pavlović, V., … Nedović, V. (2017). Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder. *Journal of Microencapsulation*, *0*(0), 1–13. https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354939

Kladniew, R. B., Villegas, M. S., García, P. M., & Bravo, de M. (2016). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTOXICA DE MONOTERPENOS EN CÉLULAS TUMORALES Y NORMALES. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/55686/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1

López-Alarcón, C.; Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natu¬ral products: A review on chemical and cel¬lular-based assays. *Analytica Chimica Acta, 763(6): 1–10*.

López, O. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión Microencapsulation of oily substances by aspersion drying. *Revista Cubana de Farmacia*, *44*(3), 381–389.

Mohajer, S. (2014). Anthocyanin Production , Antioxidant Potential and Antitumor Activity of Celosia cristata against Hct116 Cell Line, (October).

Moldovan B, David L, Chişbora C, C. C. (2012). Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (Viburnum opulus L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. Molecules, *17*, 11655–11666.

Monteros, C., Cuesta, X., Jimenez, J., & López, G. (2005). Las papas nativas en el Ecuador, *Primera ed*, 26.

Monteros, C., Cuesta, X., Jimenez, J., & López, G. (2013). Variedades INIAP-Yana Shungo e INIAP- Puca Shungo : una experiencia exitosa de innovación tecnológica y comercial con varios actores de la cadena en, 2013.

Monteros, C., & Pallo, E. (2009). Conservación y revalorización de papas nativas con pequeños productores de la provincia Bolívar , Ecuador Preservation and adding new value to native potatoes with small farmers in the province of Bolivar , Ecuador Introducción Metodología Resultados y di, *15*, 78–85.

Monteros, C., Yumisaca, F., Tello, C., Reinoso, I., Garófalo, J., Andrade-piedra, J., & Cuesta, X. (2011). FICHA TECNICA DE LA VARIEDAD DE PAPA INIAP – YANA SHUNGO 1. *INIAP*, 1–13.

Monteros Guerrero, A. (2016). RENDIMIENTOS DE PAPA EN EL ECUADOR SEGUNDO CICLO 2015. *Dirección de Análisis Y Procesamiento de La Información, Coordinación General Del Sistema de Información Nacional Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura Y Pesca*, *2015*, 11.

Opferman, J. T., & Kothari, A. (2017). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. https://doi.org/10.1038/cdd.2017.170

Ortíz, M. A., Reza, C., Gerardo, R., Madinaveitia, C., Ciencias, F. De, Universidad, Q., … Artículo, A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*.

Pereira-Kechinski, C.; Ramos-Guimar¬aes, P.V.; Zapata-Noreña, C.P.; Tes¬saro, I.C.; Ferreira-Marczak, L. . (2010). Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Food Science*, *75*, 173–176.

Persi, F. A. ., Rinaldini, E., Carrión, A., Hapon, M. B., & Gamarra-Luques, C. (2017). EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTITUMORAL PROPERTIES OF TESSARIA ABSINTHIOIDES (HOOK & ARN) DC, “PÁJARO BOBO”, AQUEOUS EXTRACT.

Ramírez-García, MA Márquez-González, G Barranco-Lampón, & López-Aguilar, J. (2014). Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *Medigraphic*, *9*(3), 84–94.

Ramos, N. C. (2008). Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. *Iniap*, *12*, 10. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Reyes, L. (2010). Optimización y caracterización de la microencapsulación de la proteasa hemisfericina refinada. *Instituto Nacional de México*, 14.

Rigon, R. T., & Zapata Noreña, C. P. (2016). Microencapsulation by spray-drying of bioactive compounds extracted from blackberry (rubus fruticosus). *Journal of Food Science and Technology*, *53*(3), 1515–24. https://doi.org/10.1007/s13197-015-2111-x

Salinas M. Y., S. R. J. y E. T. E. (2010). Aprovechamiento y Distribución de Maíz Azul en el Estado de México. Retrieved from www.sagarpa.gob.mx.

Shipp, J. A.-A. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, *4*, 7–22.

Shurvell, H. F. (2006). Spectra- Structure Correlations in the Mid- and Far-Infrared. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, *3*, 1783–1816. https://doi.org/10.1002/0470027320.s4101

Sosa, R. D. (2012). Apoptosis, 6. Retrieved from https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf

Szymanowska, U., Złotek, U., Karaš, M., & Baraniak, B. (2015). Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. *Food Chemistry*, *172*, 71–77. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.043

Villena Martín MJ, Hernández Morales ME, L. G. V. y R. M. M. (2009). Técnicas de microencapsulación : una propuesta para microencapsular. *ARS Pharmaceutica*, *50*, 43–50.

Zapata, L. M., Heredia, A. M., Quinteros, C. F., Malleret, A. D., Clemente, G., & Cárcel, J. A. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia Y Tecnología*, *25*(49), 166–192.

ANEXOS:

Anexo A. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Fan et al., 2008)

Yana-shungo			**Puca-shungo**		
Réplica	**Absorbancia**	**[ ]** $antocianinas\frac{mg}{100g}$	**Réplica**	**Absorbancia**	**[ ]** $antocianinas\frac{mg}{100g}$
1	0,334	34,01	1	0,305	31,06
2	0,338	34,42	2	0,318	32,38
3	0,384	39,1	3	0,298	30,34
4	0,375	38,18	4	0,319	32,49
Promedio		**36,43**	promedio		**31,57**

Anexo B. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Giusti & Wrolstad, 2001)

Puca-shungo					
Replicas	**pH**	**Abs520nm**	**Abs700nm**	**Abs**	**[]** $antocianinas\frac{mg}{100g}$
1	pH1	0,734	0,018	0,632	46,6
	pH4,5	0,119	0,035		
2	pH1	0,796	0,029	0,706	52,3
	pH4,5	0,077	0,016		
3	pH1	0,74	0,005	0,669	50,4
	pH4,5	0,082	0,016		
4	pH1	0,626	-0,016	0,589	43,5
	pH4,5	0,081	0,028		
promedio					**48,2**
Yana-shungo					
Replicas	**pH**	**Abs520nm**	**Abs700nm**	**Abs**	**[]** $antocianinas\frac{mg}{100g}$
1	pH1	0,73	0,024	0,681	50,2
	pH4,5	0,034	0,009		
2	pH1	0,726	-0,024	0,717	53,1
	pH4,5	0,056	0,023		
3	pH1	0,749	0,011	0,738	55,6
promedio					**52,97**

Anexo C. Determinación de antocianinas de las variedades de papa Puca-shungo y Yana-shungo por el método propuesto por (Abdel-Aal & Hucl, 1999)

Yana-shungo			**Puca-shungo**		
Réplica	**Absorbancia**	**[]** $antocianinas\frac{mg}{100g}$	**Réplica**	**Absorbancia**	**[ ]** $antocianinas\frac{mg}{100g}$
1	0,777	67,18	1	0,724	62,6
2	0,727	62,85	2	0,624	53,95
3	0,797	68,91	3	0,720	62,26
4	0,746	64,5	4	0,746	64,5
Promedio	0,746	**65,86**	promedio		**60,83**

Anexo D. Datos del diseño experimental de parámetros optimizados en el proceso de extracción de antocianinas

BLOQUE	Relación	Tiempo	% Sólidos Extraídos	Antocianinas mg/100g
1	20,0	37,5	18,42	81,88
1	20,0	60,0	24,40	87,50
1	30,0	37,5	19,41	52,66
1	25,0	37,5	16,41	65,54
1	30,0	60,0	20,26	53,87
1	20,0	15,0	17,99	77,90
1	25,0	60,0	20,27	67,87
1	25,0	15,0	17,28	63,12
1	30,0	15,0	18,55	51,10
2	20,0	37,5	25,9	80,58
2	20,0	60,0	34,5	85,52
2	30,0	37,5	34,71	55,16
2	25,0	37,5	29,01	66,75
2	30,0	60,0	33,70	54,64
2	20,0	15,0	26,75	80,15
2	25,0	60,0	38,64	74,70
2	25,0	15,0	19,75	65,45
2	30,0	15,0	30,17	54,73

Anexo E. Tablas de Annova de cada uno de los métodos utilizados para la extracción de antocianinas

Método 1

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Valor-P*
Entre grupos	47,2392	1	47,2392	0,0131
Intra grupos	23,3634	6	3,89389	
Total (Corr.)	70,6026	7		

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	*Media*	*Grupos Homogéneos*
P	4	31,5675	X
Y	4	36,4275	X

Método 2

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	38,9505	1	38,9505	3,20	0,1338
Intra grupos	60,9067	5	12,1813		
Total (Corr.)	99,8571	6			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	*Media*	*Grupos Homogéneos*
P	4	48,2	X
Y	3	52,9667	X

Método 3

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	50,6521	1	50,6521	3,46	0,1124
Intra grupos	87,9357	6	14,6559		
Total (Corr.)	138,588	7			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Método con parámetros optmizados

	Casos	*Media*	*Grupos Homogéneos*
P	4	60,8275	X
Y	4	65,86	X

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
A:Relacion	2447,31	1	2447,31	776,48	0,0000
B:Tiempo	83,4769	1	83,4769	26,49	0,0002
AB	18,8805	1	18,8805	5,99	0,0293
Bloques	14,6521	1	14,6521	4,65	0,0504
Error total	40,9733	13	3,15179		
Total (corr.)	2605,29	17			

R-cuadrada = 98,4273 porciento

Antoc = 121,935 - 2,34408*Relacion + 0,458611*Tiempo - 0,0136556*Relacion*Tiempo

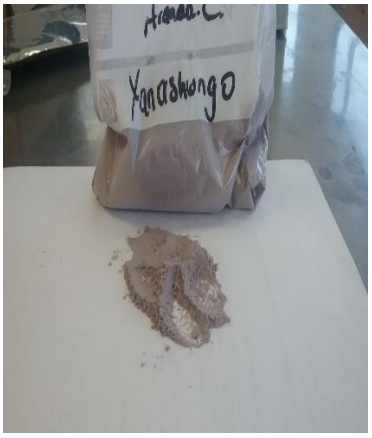
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Antoc

Valor óptimo = 86,1835

Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Relacion	20,0	30,0	20,0
Tiempo	15,0	60,0	60,0

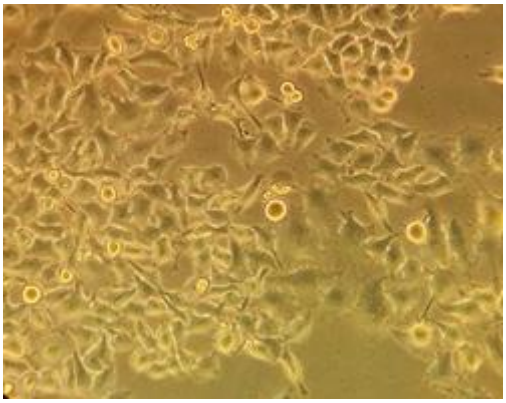
Anexo F. Secado de ojuelas y obtención de harina de papa



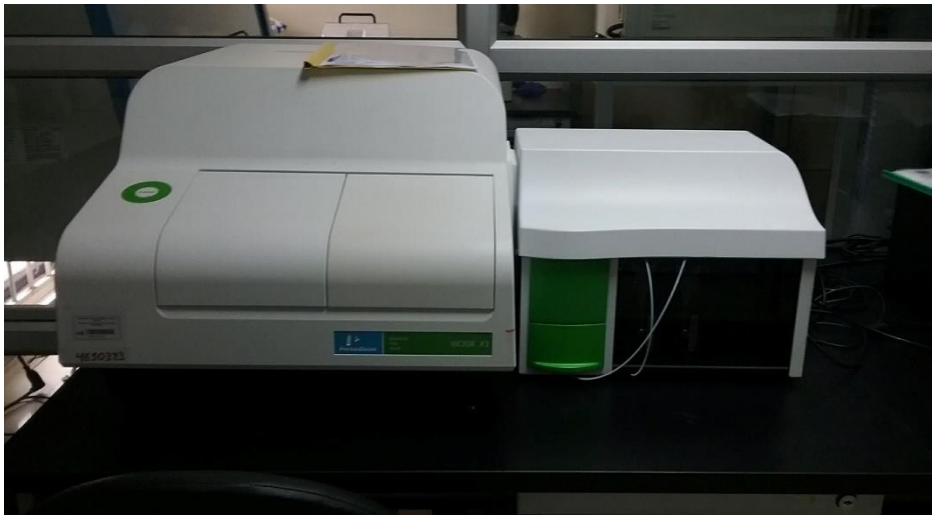
Anexo G. Evaporación del solvente y microencapsulado de antocianinas

Anexo H. Espectrofotometría infrarroja

Anexo I. Cultivo y crecimimento celular



Anexo J. Lector de placas de 96 pocillos para ensayo de MTT

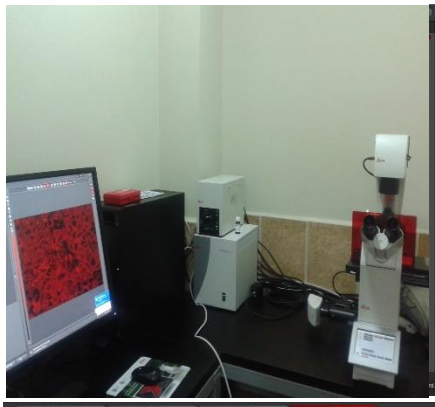


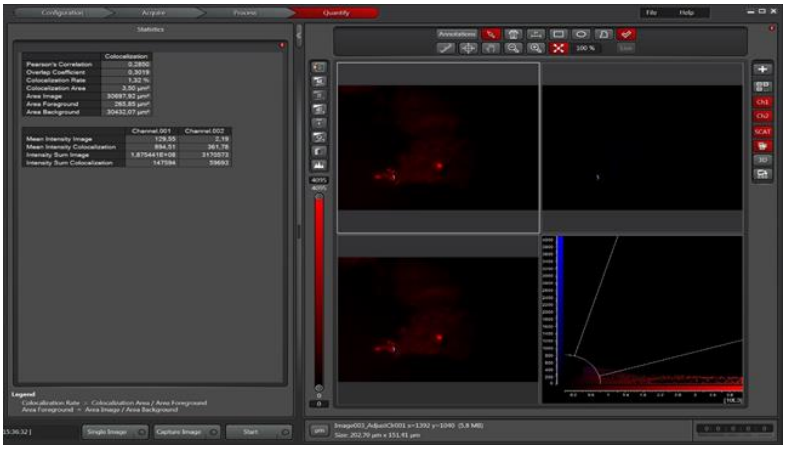
Anexo K. Concentración de antocianinas % de viabilidad de células para la elaboración de la curva del MTT a pH 1,42 y pH 3,43

[M3] mg/mL	% HeLa cells viability		
X	A:Y1	A:Y2	A:Y3
-10.32192810	104.91684540	98.37897011	105.41337800
-9.32192809	98.83258554	100.28277730	100.20971460
-8.32192809	92.81115924	91.07680346	99.81821495
-7.32192809	96.63482316	101.86713990	99.93433017
-6.32192809	96.83987920	99.21177474	95.04367807
-5.32192809	89.62691643	92.26110650	88.13492314
-4.32192809	55.99208902	66.47932006	80.45847028
-3.32192809	15.31201085	12.89095295	11.45324801
-2.32192809	13.68035553	13.39015007	16.05369070

log2 [M3] mg/mL	% HeLa cells viability			
X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4
-8.32192809	87.92078190	89.63800994	89.89023779	93.77127872
-7.32192809	76.20067467	83.06465298	80.89954861	81.59311791
-6.32192809	74.50852937	79.95005321	77.91645824	75.40733560
-5.32192809	70.17189776	67.40185832	71.71253005	67.69440454
-4.32192809	48.68031434	52.85418623	50.17156817	60.82781415
-3.32192809	18.16708189	21.08944513	24.33232794	19.73088659

Anexo L. Microscopia de fluoresencia





Anexo M. Conteo de células totales, positivas y colocalización para realizar el análisis estadístico de los ensayos inmunocitoquímicos

m3 papa morada BAX pH 3.43				
No	POSITIVAS	TOTALES	Colocalización	
1	18	21	220,47	
2	17	23	150,17	
3	23	25	138,97	
4	10	11	129,67	
5	33	36	159,65	
6	27	30	171,33	
7	10	10	136,71	
8	12	13	126,67	
9	28	31	159,81	
10	27	29	125,58	
11	9	13	132,01	
12	12	14	166,07	
13	32	33	163,08	
14	13	13	203,98	
15	15	16	238,04	
16	21	22	251,42	
17	12	12	233,42	
18	12	13	200,18	
19	20	20	212,65	
20	25	25	217,78	
21	16	16	218,01	
22	22	22	275,4	
23	15	18	200,02	
24	18	19	213,31	
25	16	17	92,6	
26	24	28	85,49	
27	17	19	78,75	
28	16	21	80,26	
29	10	14	73,62	
30	11	16	75,71	
31	13	15	88,35	
32	11	15	70,75	
33	9	11	75,17	
34	11	13	103,8	
35	13	15	93,53	
36	17	18	92,51	
37	7	13	81,4	
38	18	23	77,15	
39	13	17		

Anexo N. Medias DS del número de células positivas e intensidad de expresión en células control y tratadas

EXPRESIÓN DE BAX		
Control	**pH 1,4**	**pH 3,4**
media±DS	media±DS	media±DS
Número de células positivas por campo 630X		
12,91±6,64	12,03±6,78	18,03±6,81
Intensidad por campo 630X		
179,21± 43,38	282,10±36,66	164,36±57,71
EXPRESIÓN DE BCL2		
Número de células positivas por campo 630X		
21±11,92	12,59±6,83	12,97±9,62
Intensidad por campo 630X		
178,87± 58,76	245,61± 63,90	190,62 ±65,01
EXPRESIÓN DE CASPASA 8		
Número de células positivas por campo 630X		
36,32±12,28	21,77±8,046	27,28±6,85
Intensidad por campo 630X		
196,03± 26,87	233,23± 71,21	137,33±58,84

			m3 papa morada BAX ph 3.43	
No	POSITIVAS	TOTALES	Colocalización	
1	18	21	220,47	
2	17	23	150,17	
3	23	25	138,97	
4	10	11	129,67	
5	33	36	159,65	
6	27	30	171,33	
7	10	10	136,71	
8	12	13	126,67	
9	28	31	159,81	
10	27	29	125,58	
11	9	13	132,01	
12	12	14	166,07	
13	32	33	163,08	
14	13	13	203,98	
15	15	16	238,04	
16	21	22	251,42	
17	12	12	233,42	
18	12	13	200,18	
19	20	20	212,65	
20	25	25	217,78	
21	16	16	218,01	
22	22	22	275,4	
23	15	18	200,02	

24	18	19	213,31	
25	16	17	92,6	
26	24	28	85,49	
27	17	19	78,75	
28	16	21	80,26	
29	10	14	73,62	
30	11	16	75,71	
31	13	15	88,35	
32	11	15	70,75	
33	9	11	75,17	
34	11	13	103,8	
35	13	15	93,53	
36	17	18	92,51	
37	7	13	81,4	
38	18	23	77,15	
39	13	17		
40	15	16	108,26	

ss