



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**Y BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

Extracción y microencapsulado de carotenoides con actividad antioxidante a partir de *Pouteria sapota*.

---

Proyecto de trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Jarol Damian Guevara Gonzalez

**Tutor:** PhD. Orestes Darío López Hernández

**AMBATO - ECUADOR**

**Enero - 2020**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Orestes López Hernández

### **CERTIFICA**

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

Ambato, 14 de Enero del 2020



.....  
PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jarol Damian Guevara Gonzalez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Jarol Damian Guevara Gonzalez

C.I. 080273151-3

**AUTOR**

## **APROBACIÓN 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 y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para consistencia firman:



.....

Presidente del Tribunal



.....

Ph.D. Milton Ruben Ramos Moya

C.I. 180111963-5



.....

Mg. Walter Aurelio Simbaña Ayo

C.I. 170918085-3

Ambato, 15 de Enero del 2020

## **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.



Jarol Damian Guevara Gonzalez

C.I. 080273151-3

**AUTOR**

## DEDICATORIA

*A Dios*

*Por iluminarme en los momentos duros de mi vida y haberme dado la mejor madre del mundo.*

*A mi madre*

*Esther, por su garra de mujer luchadora y trabajadora, quien siempre estuvo pendiente de sus tres hijos para que sean buenas personas y ahora desde el alguna parte nos cuida. “Yo sé que llegarás lejos”.*

*A mis hermanos*

*Cristhian y David, a pesar de las situaciones de nuestra vida desde la niñez, hemos llegado a ser personas de bien.*

*A mis sobrinos*

*Melanie y Alexander, niños hermosos que ha sido la motivación de mi juventud.*

*A mi gran amigo y colega*

*Cheleins, por haber sido un gran compañero con su singular forma de ser y querer a sus amigos.*

## AGRADECIMIENTO

A mi madre por ser luz y paz en mi vida, por haberme enseñado buenos valores, a luchar por mis sueños y a no darme por vencido.

A mi hermano Cristhian y su esposa Raquel, por su ayuda a lograr esta meta con sus palabras y buenas acciones.

A mis tías Elda, Bertha y Carminia, que siempre estuvieron pendientes de mi proceso para ser un profesional.

A mi primo Darío y su esposa Sandra, porque nunca dejaron de confiar en mi madre.

A mi tutor PhD. Orestes López, por su gran apoyo y referencia de conocimientos y vivencias en el desarrollo de mi tesis.

A mis amigos Max, Alexander, Erick, Joe, Eduardo, Galo y Leticia, por sus buenos consejos y apoyo en esta trayectoria de vida.

A mis compañeros y amigos Dani, Cheleins, Ruth, Ferney y Pedrin, por haber formado parte de estos años de estudio, que sin duda serán siempre gratos recuerdos.

# ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## Contenido

<b>CAPÍTULO I</b> .....	13
<b>1.1 Antecedentes Investigativos</b> .....	13
<b>1.1.1 <i>Pouteria sapota</i> (Jacq.) H.E. Moore &amp; Stearn</b> .....	13
<b>1.1.2 Antioxidantes presentes en <i>P. sapota</i></b> .....	14
<b>1.1.3 Estrés oxidativo</b> .....	15
<b>1.1.4 Mecanismo antioxidante</b> .....	15
<b>1.1.4 Factores que influyen extracción y estabilidad de los carotenoides</b> .....	16
<b>1.1.6 Microencapsulación</b> .....	17
<b>1.1.7 Importancia de la microencapsulación</b> .....	17
<b>1.2 Objetivos</b> .....	17
<b>1.3 Hipótesis</b> .....	18
<b>1.3.1 Hipótesis Nula</b> .....	18
<b>1.3.2 Hipótesis Alternativa</b> .....	18
<b>1.4 Variables</b> .....	18
<b>1.4.1 Variables Dependiente</b> .....	18
<b>1.4.2 Variable Independiente</b> .....	18
<b>CAPÍTULO II</b> .....	19
<b>2.1 Materiales</b> .....	19
<b>2.1.1 Materiales de laboratorio</b> .....	19
<b>2.1.2 Equipos de laboratorio</b> .....	19
<b>2.1.3 Reactivos</b> .....	19
<b>2.2. Métodos</b> .....	20
<b>2.2.1 Trabajo de campo</b> .....	20
<b>2.2.2. Caracterización de <i>P. sapota</i></b> .....	20
<b>2.2.3 Preparación del material vegetal</b> .....	21
<b>2.2.4 Extracción de carotenoides</b> .....	21
<b>2.2.5 Análisis del extracto</b> .....	22
<b>2.2.6 Análisis Estadístico</b> .....	22
<b>2.2.7 Microencapsulación del concentrado</b> .....	23
<b>2.2.8 Eficiencia de la microencapsulación</b> .....	23



2.2.9 Espectrofotometría Infrarroja .....	24
2.2.10 Evaluación de la actividad antioxidante del concentrado microencapsulado <i>in vitro</i> .....	24
2.2.11 Evaluación de la actividad antioxidante del concentrado microencapsulado <i>in vivo</i> .....	25
<b>CAPÍTULO III</b> .....	27
3.1 Análisis y discusión de resultados.....	27
3.1.1 Caracterización del fruto del mamey ( <i>P. Sapota</i> ).....	27
3.1.2 Extracción de carotenoides.....	28
3.1.3 Análisis de la eficiencia de microencapsulación .....	30
3.1.4 Análisis por espectrofotometría infrarroja FT-IR.....	31
3.1.5 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del microencapsulado.....	33
3.2 Verificación de hipótesis.....	36
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	38
4.1 Conclusiones .....	38
4.2 Recomendaciones .....	39
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	47

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Tablas

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía del zapote mamey.....	14
<b>Tabla 2.</b> Características del zapote mamey.....	27
<b>Tabla 3.</b> Análisis de Varianza para Carotenoides extraídos de zapote mamey .....	28
<b>Tabla 4.</b> Respuesta Óptima.....	29
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de eficiencia de microencapsulación (% EM) .....	31
<b>Tabla 6.</b> Resultados de inhibición por DPPH.....	34

### Figuras

Figura 1. Fruto del zapote mamey. (Paulín et al., 2015) .....	14
Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para carotenoides extraído de zapote mamey .....	29
Figura 3. Gráfica de superficie de respuesta estimada de los efectos principales en la extracción de carotenoides. MV/VD= relación de masa el material vegetal con el disolvente etanol 96 %. Los carotenoides tienen una concentración en mg/100 g y el tiempo en minuto .....	30
Figura 4. Espectrofotometría infrarrojo FT-IR para comprobar la eficiencia del microencapsulado. A) Espectro del concentrado de carotenoides; B) Espectro del microencapsulado de carotenoides; C) Espectro de la mezcla polimérica.....	32
Figura 5. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> frente a un estrés oxidativo inducido por $\text{H}_2\text{O}_2$ 3 $\text{mmol}^{-1}$ .....	35
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> frente a un estrés oxidativo inducido por $\text{H}_2\text{O}_2$ 0,5 $\text{mmol}^{-1}$ .....	36

## RESUMEN

Es bien sabido que los carotenoides son compuestos que poseen un alto poder antioxidante y su aporte en la dieta humana tiene grandes beneficios para salud. El presente trabajo de investigación se enfocó en la extracción, microencapsulación y análisis de carotenoides presentes en zapote mamey (*Pouteria sapota*) por sus propiedades antioxidantes, en base a un diseño experimental de superficie, por lo cual se determinó que las condiciones óptimas fueron de 30 minutos con una relación masa vegetal-disolvente de 1:67 utilizando como disolvente etanol al 96 % a una temperatura de 70 °C. Para preservar los carotenoides frente a factores externos se realizó el proceso de microencapsulación por el método de secado por aspersión, con una mezcla polimérica de maltodextrina y goma arábiga en proporciones iguales. La eficiencia del proceso de microencapsulación fue analizada mediante espectrofotometría infrarroja FT-IR, los espectros obtenidos demostraron la protección de la mezcla polimérica a los antioxidantes. La actividad antioxidante se determinó mediante ensayo *in vitro* por el método DPPH obteniéndose valores equivalentes de Trolox de 253,21  $\mu\text{mol}^{-1}$  para el extracto concentrado y de 385,19  $\mu\text{mol}^{-1}$  para el microencapsulado. Además, se analizó la actividad antioxidante *in vivo* a través de la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* del microencapsulado a una concentración de 50 mg/ml con absorbancias máximas de 1,259 y 1,335 para peróxido de hidrógeno 3  $\text{mmol}^{-1}$  y 0,5  $\text{mmol}^{-1}$  respectivamente comparado con la vitamina C como antioxidante modelo.

**Palabras claves:** Secado por aspersión, polímeros, microcápsulas.

## ABSTRACT

It is well known that carotenoids are compounds that have a high antioxidant power and their contribution to the human diet has great health benefits. The present research work focused on the extraction, microencapsulation and analysis of carotenoids present in mamey zapote (*Pouteria sapota*) for its antioxidant properties, based on an experimental surface design, so it was determined that the optimal conditions were 30 minutes with a vegetable-solvent mass ratio of 1:67 using 96 % ethanol as solvent at a temperature of 70 °C. To preserve the carotenoids against external factors, the microencapsulation process was carried out by the spray drying method, with a polymeric mixture of maltodextrin and gum arabic in equal proportions. The efficiency of the microencapsulation process was analyzed by FT-IR infrared spectrophotometry, the spectra obtained demonstrated the protection of the polymer mixture to antioxidants. The antioxidant activity was determined by an *in vitro* assay by the DPPH method, obtaining equivalent Trolox values of 253,21  $\mu\text{mol}^{-1}$  for the concentrated extract and 385,19  $\mu\text{mol}^{-1}$  for the microencapsulation. In addition, the *in vivo* antioxidant activity was analyzed through the *Saccharomyces cerevisiae* growth curve of the microencapsulate at a concentration of 50 mg / ml with maximum absorbances of 1,259 and 1,335 for 3  $\text{mmol}^{-1}$  and 0,5  $\text{mmol}^{-1}$  hydrogen peroxide respectively compared to vitamin C as an antioxidant model.

**Keywords:** Spray drying, polymers, microcapsules.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes Investigativos

Las investigaciones en la medicina han demostrado la importancia de los antioxidantes para beneficio de la salud. Estas sustancias previenen o aplazan el deterioro, daño o destrucción provocados por una oxidación (Youngson, 2003). El mecanismo de defensa antioxidante impide que otras moléculas se unan al oxígeno. Al reaccionar–interactuar más rápido con los radicales libres de oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presente. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones ya que son muchos los procesos patológicos implicados por el estrés oxidativo que trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano (Venero, 2002).

Uno de los antioxidantes más conocidos son los flavonoides. En su estructura química contiene un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades para formar complejos con el hierro y otros metales de transición, lo que les confiere un gran poder antioxidante para el cuerpo (Huerta et al., 2005). Por ello, desempeñan un papel importante frente a la protección de daño oxidativo. Además, tiene efectos terapéuticos en un elevado número de enfermedades, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Martínez et al., 2002).

#### 1.1.1 *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn

*Pouteria sapota* es una especie introducida-cultivada para el Ecuador, de hoy en adelante, citado en el texto como zapote mamey, pertenece a la familia Sapotaceae (Silva et al., 2009).

El zapote mamey es originario de la región tropical de América Central, es de gran importancia debido al amplio uso del árbol (fruta, semilla y madera) para consumo humano (Mercuri et al., 2016). Su forma puede ser redonda u ovalada dependiendo del cultivar, su corteza es dura y rugosa, de color marrón oscuro, la pulpa de la fruta es dulce, suave y

anaranjada o roja cuando está madura (Díaz et al., 2003). Según Ramos et al. (2009), el color de la pulpa de zapote mamey es uno de los principales factores de aceptación por el consumidor. Por lo general no contiene fibra, y su sabor es muy dulce con un suave y delicado aroma. Contiene en su interior una semilla, pero en algunos casos posee hasta dos semillas (Domínguez et al., 2010). Su maduración se caracteriza hasta un cierto punto por disminución de la firmeza, incremento de azúcares y carotenoides totales (Ramos et al., 2009).



Figura 1. Fruto del zapote mamey. (Paulín et al., 2015)

### 1.1.1.2 Taxonomía

**Tabla 1.** Taxonomía del zapote mamey

Phyllum	Plantae
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Orden	Ericales Bercht. & J. Presl
Familia	Sapotaceae Juss.
Genero	<i>Pouteria</i> Aubl
Especie	<i>sapota</i>

Nota. Fuente: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)

### 1.1.2 Antioxidantes presentes en *P. sapota*

La coloración naranja de la pulpa del zapote mamey se debe a los carotenoides, los cuales aumentan durante la maduración (Alia et al., 2002). Algunos de los pigmentos son de color pardo rojizo a naranja (Domínguez et al., 2010). Según Alia et al. (2007), la fruta confiere

un valor biológico, tales como: la vitamina C, Tiamina, Riboflavina y Niacina por su alta capacidad antioxidante, y a los  $\beta$ -carotenos como precursores de la provitamina A. Respecto al contenido de carotenoides totales, se encontraron valores entre 1,2 y 1,5 mg de  $\beta$ -carotenos en 100 g de fruta. Esto indica que los frutos de mamey poseen carotenoides mismos que aportan nutrientes necesarios para la dieta humada (Sauri et al., 2007).

### **1.1.3 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libre, que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa del cuerpo (Ramos et al., 2006). Este daño está relacionado con el envejecimiento. Se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Avello et al., 2006).

Los radicales libres o especies reactivas al oxígeno se producen continuamente en el organismo como parte del metabolismo, siendo los antioxidantes que permiten proteger al organismo del daño oxidativo y mantener el balance (Coronado et al., 2015). Sin embargo, el organismo es vulnerable al daño que producen las radicales libres bajo ciertas condiciones, como cuando los sistemas de defensa son ineficientes, en dietas mal balanceadas, desnutrición o patologías que no permitan la absorción de antioxidantes o la adecuada síntesis de enzimas que destruyan a las radicales libres y reparen el daño oxidativo (Huerta et al., 2005).

### **1.1.4 Mecanismo antioxidante**

Para Huerta et al. (2005), los antioxidantes tienen un gran poder para disminuir la carga de radicales libres en el organismo. Además, juegan un rol fundamental en la prevención de varias enfermedades como: problemas cardiovasculares, tumorales, enfermedades degenerativas e incluso el proceso de envejecimiento. Para comprender mejor la función fisiológica de los antioxidantes en el organismo es necesario recordar que el oxígeno actúa como carburante en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas; liberándose dióxido de carbono, agua, energía calórica y diversos catabolitos. No obstante, el

incremento de los procesos metabólicos se acompaña de la producción de radicales libres (Zamora, 2007).

Por su parte, las moléculas antioxidantes tienen la propiedad de anular la acción de los radicales oxidativos mediante varios mecanismos, como son su aniquilación o la transferencia de electrones que transforman al radical en una molécula inactiva, cortando la cadena de reproducción de radicales derivados. Existen varias moléculas con estas propiedades antioxidantes como por ejemplo la vitamina C, algunas especies polifenólicas y los flavonoides (Moss, 2006). Estudios por la Sociedad Americana contra el Cáncer (American Cancer Society) considera que lo más recomendable en el control del estrés oxidativo por reforzamiento de los sistemas antioxidantes para la prevención del cáncer, es incrementar el consumo de frutas y vegetales en la dieta, lo cual se ha asociado con una reducción del riesgo de enfermedades crónicas. (García et al., 2013).

#### **1.1.4 Factores que influyen extracción y estabilidad de los carotenoides**

##### **Temperatura**

Las condiciones térmicas aumentan sustancialmente las concentraciones de los isómeros *cis* del  $\alpha$ -y  $\beta$  caroteno mientras que los isómero *trans* disminuyeron en un 26 y 35 por ciento respectivamente, lo que convierte los carotenos *trans* en isómeros con una menor actividad de vitamina A (Rodríguez, 1999).

##### **Disolvente**

Los carotenoides son compuestos lipídicos, aunque existen algunas excepciones, por lo que son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como acetona, metanol, éter dietílico, hexano, cloroformo y piridina, entre muchos otros (Meléndez et al 2007). Por ellos las propiedades de los carotenoides libres o en disolventes orgánicos son significativamente diferentes (Sánchez et al., 1999).

##### **Luz**

La propiedad de los carotenoides de absorber la luz se deriva de la presencia de enlaces dobles conjugados que conforman un cromóforo largo que posee la capacidad de absorber luz en la región visible, por esto podemos observar colores que van del amarillo al rojo, incluyendo el naranja. Este mismo sistema poliénico hace a la molécula extremadamente



sensible a la degradación oxidativa y a la isomerización inducida por la luz (Sánchez et al., 1999).

### **1.1.6 Microencapsulación**

Una microcápsula se compone de dos fases: el núcleo y la pared. El núcleo (activo o fase interna) se refiere al material específico a ser recubierto y puede estar en cualquiera estado de la materia (Villena et al., 2009). La pared de la microcápsula está determinada generalmente por los requerimientos del sistema en cuestión y su aplicación final, así como el método de microencapsulación seleccionado y las condiciones ambientales a las que las microcápsulas serán sometidas (Nava et al., 2015). Los materiales que principalmente forman la pared son polisacáridos, siendo los más conocidos los alginatos, la goma gelana, la goma arábica y maltodextrina (González et al., 2014).

### **1.1.7 Importancia de la microencapsulación**

En la actualidad uno de los métodos más utilizados para la conservación de las propiedades fisicoquímicas de sustancias químicas es la microencapsulación asistido por la tecnología de secado por aspersion, que protege a los materiales encapsulados de factores como temperatura y humedad, permitiendo su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor (Castañeta et al., 2011). En el caso de fármacos cuya liberación se lleva a cabo en el estómago o en el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas (Villena et al., 2009).

## **1.2 Objetivos**

### **Objetivo General**

Extraer, microencapsular y evaluar la actividad antioxidante de los carotenoides del zapote mamey.

### **Objetivos Específicos**

- Caracterizar la fruta de *P. sapota* mediante análisis fisicoquímicos.
- Determinar los parámetros óptimos de extracción de carotenoides de *P. sapota* mediante la aplicación de un diseño experimental de superficie de repuesta.
- Microencapsular los carotenoides extraídos de *P. sapota*.

- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del producto final microencapsulado.

### **1.3 Hipótesis**

La extracción, concentración y microencapsulación de componentes de *P. sapota* influyen en la actividad antioxidante.

#### **1.3.1 Hipótesis Nula**

La extracción, concentración y microencapsulación de componentes de *P. sapota* no influye en la actividad antioxidante.

#### **1.3.2 Hipótesis Alternativa**

La extracción, concentración y microencapsulación de componentes de *P. sapota* influye la actividad antioxidante.

### **1.4 Variables**

#### **1.4.1 Variables Dependiente**

Propiedad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del extracto de *P. sapota*

#### **1.4.2 Variable Independiente**

Disolvente de extracción, tiempo de extracción, cantidad de masa.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1 Materiales

##### 2.1.1 Materiales de laboratorio

Para realizar el proceso se requirió el uso de los siguientes materiales: matraces Erlenmeyer de 100, 200 y 1000 ml, probetas graduadas de 25 ml y 100 ml, balones de aforo de 100 ml, pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml, micropipetas de 20-200  $\mu$ l, peras de succión, barra de agitación, espátula magnética, placas de 96 pocillos y cubetas para un espectrofotómetro UV-Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO), frascos de vidrio color ámbar de 100 ml, tubos Falcon de 50 ml, termómetro de -10 a 110 °C.

##### 2.1.2 Equipos de laboratorio

En el proceso de secado y molinado del material vegetal se usó una estufa (Gander MTN) y un molino manual marca (Corona). Para la extracción de los carotenoides del zapote ma zapote mamey se requirió de los siguientes equipos: plancha de calentamiento (Corning PC-620), centrífuga (Rotina 380), balanza analítica (Ohaus PA-214), balanza de humedad (KERN MLS 50-3), rotoevaporador (IKA-RV8). En el proceso de microencapsulación y determinación de la actividad antioxidante se requirió de un mini Spray Dryer (BUCHI-B 290), espectrofotómetro UV-Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO), espectrofotómetro infrarrojo FT-IR, cámara de flujo laminar, incubadora, agitador con control de las condiciones de incubación (New Brunswick Scientific)

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurión XVIII (STATGRAPHICS Centurion XVIII, 2018)

##### 2.1.3 Reactivos

En el proceso de extracción se usó etanol al 96 % y agua destilada. Para la microencapsulación se usaron dos polímeros: goma arábica y maltodextrina. En el análisis de la actividad antioxidante *in vitro* se utilizó: Agua destilada, DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl y Trolox 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl chroman-2-carboxylic ácido 97 %.

Y para la determinación de la actividad antioxidante *in vivo* se usaron: vitamina C 500 mg/ml (Bayer), peróxido de hidrógeno, medio YPD y solución amortiguadora PBS.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1 Trabajo de campo**

Un total de 15 frutas maduras y en buen estado fueron colectados en la Parroquia Zarate (0°19'14.2"N; 79°25'52.1"W), perteneciente al cantón Quinde, provincia de Esmeraldas. Subsecuentemente, las frutas fueron guardadas dentro de una funda de papel a temperatura ambiente para su transporte seguro a los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (UODIDE-ICIA, FCIAB) para su respectivo procesamiento.

### **2.2.2. Caracterización de *P. sapota***

#### **Tamaño y Peso**

Se tomó una muestra al azar de 10 zapotes mamey, y se midió el ancho y altura del fruto usando un calibrador pie de rey (Kex Germany) de 0 a 150 ± 0,05 cm de precisión, además del peso de la fruta.

#### **pH**

Con el uso de una licuadora se obtuvo aproximadamente 100 ml de pulpa de zapote mamey y con la ayuda de un potenciómetro digital (marca HANNA HI 2221) se midió el pH de la fruta.

#### **Grados Brix**

Se usó un refractómetro manual (BOECO) para determinar los sólidos solubles asociados al contenido de azúcar, luego se dejó caer una gota del jugo en el prisma del refractómetro y se procedió a tomar la lectura.

#### **Humedad**

Se colocó aproximadamente 3 g de zapote mamey en una balanza de humedad (marca Citizen modelo MB 200) y se obtuvo la lectura del porcentaje de humedad del fruto.

### **2.2.3 Preparación del material vegetal**

Una vez en el laboratorio de la FCIAB, se procedió a descascarar la fruta para retirar la pulpa. Subsecuentemente, la pulpa fue cortada en trozos hasta poder ubicada en el secador de bandeja (Gander MTN) a 60 °C por un periodo de 72 horas. Esto permitió eliminar la mayor cantidad de agua de la fruta. Finalmente, el material vegetal seco se pasó por un molino hasta obtener un polvo fino, mismo que se guardó en un recipiente de vidrio limpio para su conservación.

### **2.2.4 Extracción de carotenoides**

Se realizó un proceso de separación sólido – líquido con etanol como disolvente orgánico en combinación con tres relaciones de masa distinta de 1:60, 1:70 y 1:80 de material vegetal con respecto al disolvente. Para la primera relación 1:60 se pesó 0,833 g de material vegetal seco en una balanza analítica (Ohaus PA-214) y se añadió 50 ml de etanol al 96 %. Para la otra relación 1:70 se pesó 0,714 g de material vegetal seco en una balanza analítica (Ohaus PA-214) y se añadió 50 ml de etanol al 96 %. Para la relación 1:80 se pesó 0,625 g de material vegetal seco en una balanza analítica (Ohaus PA-214) y se añadió 50 ml de etanol al 96 %. Las muestras fueron colocadas en matraces de 250 ml en una plancha de calentamiento (Corning PC-620D) con agitación magnética, a una temperatura de 70 °C, en tres intervalos de tiempos diferentes 30, 60, y 90 minutos respectivamente. Después se centrifugó la solución a 5000 min<sup>-1</sup> por 5 min para precipitar el material no disuelto y separar los restos vegetales del extracto líquido. Seguidamente se conservó en frascos de vidrio color ámbar.

Se midió la absorbancia de las muestras con el uso de un espectrofotómetro UV- Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO) a longitud de onda de 515 nm (Meléndez, 2017). A continuación, se determinó el mejor tiempo y relación de masa para la extracción de carotenoides de zapote mamey en base a un diseño experimental de superficie en el software estadístico StatGraphics Centurión XVIII.

### 2.2.5 Análisis del extracto

Se determinó los sólidos totales (SST) mediante la ecuación 1, las mediciones fueron por triplicado y con la ayuda de una balanza de humedad (KERN MLS 50-3).

$$SST = 100 - \% \text{ humedad}$$

Ecuación 1. Determinación de sólidos totales.

Se midió la absorbancia de cada extracto a una longitud de onda de 515 nm, (Meléndez, 2017), utilizando como blanco el etanol, en espectrofotómetro UV-Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO).

Se realizará el cálculo de la concentración (C) de carotenoides, para lo cual se usó la ecuación 2, utilizando el valor de las absorbancias medidas por triplicado.

$$C = \frac{A * 10^4}{E}$$

Ecuación 2. Concentración de carotenoides.

Para calcular la masa de sólidos extraídos (MSE) se usó la ecuación 3.

$$MSE = \frac{M * SST}{100}$$

Ecuación 3. Masa de sólidos extraídos.

También se determinó la masa de carotenoides en 100 g de sólidos extraídos con la ecuación 4.

$$mc \text{ en } 100g = \frac{mg \text{ de Volumen final}}{MSE} * 100$$

Ecuación 4. Masa de carotenoides en cien gramos de sólidos extraídos.

Como final se calculó el porcentaje de eficiencia de extracción (% E.Ex) con la ecuación 5.

$$\%E.Ex = \left( \frac{mc}{MV} \right) * 100$$

Ecuación 5. Porcentaje de eficiencia de extracción

### 2.2.6 Análisis Estadístico

Se usó un programa de computación estadístico Statgraphics Centurión 16.1 por sus posibilidades de automatización de los complejos cálculos estadísticos para el análisis de los datos (Avello et al., 2003). Se analizó la respuesta para determinar la mejor relación

entre material vegetal/volumen de disolvente y su tiempo de extracción con relación a la eficiencia de extracción y masa de carotenoides por cada 100 g de sólidos extraídos, con un diseño experimental  $3^2$ , es decir que intervienen dos factores con tres niveles, el factor A es la relación material vegetal/volumen de disolvente ( $a_0= 1:60$ ,  $a_1=1:70$ ,  $a_2= 1:80$ ) y el factor B es el tiempo de extracción ( $b_0=30$  min,  $b_1=60$  min,  $b_2=90$  min), la variable de respuesta correspondió a la concentración de carotenoides.

### **2.2.7 Microencapsulación del concentrado**

Las muestras extraídas fueron previamente concentrada a 68 °C y con una presión reducida para separar el etanol al 96 % y conservando los carotenoides con el uso del Rotoevaporador. A continuación, se realizó el proceso de microencapsulado con el equipo mini Spray dryer (BUCHI-B 290), con anterioridad se preparó la emulsión con maltodextrina, goma arábiga y el extracto acuoso, en relaciones iguales respectivamente de 50:50:50 y agitó en una plancha de calentamiento a 50 °C y 500 rpm para homogenizar la emulsión.

Luego, se alimentó la emulsión al mini Spray dryer (BUCHI - B290) para empezar la microencapsulación en la cámara del equipo con una temperatura de entrada de 150 °C y de salida de 90 °C, ambas con un intervalo de  $\pm 2^\circ\text{C}$ , con un porcentaje de flujo de aire de secado del 100 % y un flujo de aire de atomización entre 400 y 600 L/h (Figuroa et al., 2016). Una vez terminado se colectó el microencapsulado y se almacenó en una funda de sello hermético con el fin de preservar el producto.

### **2.2.8 Eficiencia de la microencapsulación**

Para determinar la eficiencia de microencapsulación, se disolvió 1 g de microencapsulado en 10 ml de agua destilada y también en 10 ml de etanol al 96 % y se agitó durante 10 min para homogenizar la solución. Luego se midió la absorbancia a 515 nm para obtener la concentración y se aplicó la siguiente ecuación (6).

$$\% E.M = \frac{\text{Concentración de agua} - \text{Concentración en etanol al 96\%}}{\text{Concentración de agua}}$$

Ecuación 6. Porcentaje de eficiencia de la microencapsulación

### **2.2.9 Espectrofotometría Infrarroja**

Con la colaboración de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencias, Laboratorio de Química Instrumental, se verificó la eficiencia de microencapsulación por medio de espectrofotometría infrarroja FT-IR, que se enfoca en la identificación de compuestos químicos y contrastar la autenticidad de un producto (Castorena et al., 2011).

### **2.2.10 Evaluación de la actividad antioxidante del concentrado microencapsulado *in vitro***

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales. No obstante, aquel que ha recibido una preferencial atención es el método que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) el cual se usó para determinar el potencial antioxidante *in vitro* del extracto microencapsulado del zapote mamey con el análogo de la vitamina E conocido como Trolox (Bobo et al., 2015). Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de Trolox a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{mol}^{-1}$ , se utilizó como disolvente para las diluciones una solución etanol y agua 50:50.

Además, se preparó una solución de 150  $\mu\text{mol}^{-1}$  del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), usando como disolvente una mezcla de metanol agua en proporción 80:20 de volumen. Se realizó una dilución 1/50 del extracto concentrado de zapote mamey, al igual que se disolvió 0,2 g del microencapsulado en 0,8 g de agua destilada, hasta llegar a una dilución 1/200. En una placa de 96 pocillos se colocó el blanco (20  $\mu\text{l}$  de agua destilada con 180  $\mu\text{l}$  de la solución metanol / agua), una muestra control (20  $\mu\text{l}$  de agua destilada con 180  $\mu\text{l}$  de la solución DPPH), luego se agregó 20  $\mu\text{l}$  de la dilución 1/10 del concentrado previamente preparado de zapote mamey, con 180  $\mu\text{l}$  de la solución DPPH y 20  $\mu\text{l}$  del microencapsulado antes preparado con 180  $\mu\text{l}$  de la solución DPPH. Se llevó la placa a una hora de incubación en espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm.

Para la obtención de los resultados en  $\mu\text{mol trolox/g}$ , primero se determinó el porcentaje de DPPH inhibido por medio de la ecuación 6, y se realizó la curva de calibración con el



porcentaje de inhibición de DPPH vs  $\mu\text{mol}$  Trolox, para obtener la ecuación de regresión lineal que permitió obtener el contenido  $\mu\text{mol}$  trolox/g del extracto como del concentrado como del microencapsulado.

$$\%DPPH = \left[ 1 - \left( \frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \right] * 100$$

Ecuación 6. Porcentaje de inhibición de DPPH

Dónde:

$A_m$  = Absorbancia medida de cada microencapsulado y del concentrado de *P. sapota*

$A_b$  = Absorbancia del blanco

$A_c$  = Absorbancia de la solución control

### **2.2.11 Evaluación de la actividad antioxidante del concentrado microencapsulado *in vivo***

Para analizar la actividad antioxidante *in vivo* del microencapsulado de zapote mamey se utilizó el protocolo propuesto por Peláez et al. (2016) y utilicé *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo modelo. Para ello, se inoculó una colonia aislada de *S. cerevisiae* en 200 ml de medio agar YPD (4 g de glucosa, 2g de levadura y 4 g de peptona) y se extendieron sobre pacas para ser incubadas a 28 °C durante 72 h. Posteriormente se inoculó una cepa de levadura en 5 mL de medio YPD líquido fresco y se incubó a 6 horas a 28 °C con agitación constante de 40  $\text{min}^{-1}$ .

Se realizó una dilución 1/10 del cultivo y se inoculó 5  $\mu\text{l}$  en 3 ml de medio líquido YPD en el que se agregó 1 ml de microencapsulado a una concentración 25 mg/mL (0,125 g de microencapsulado en 5 ml de agua destilada) y 50 mg/mL (0,25 g de microencapsulado en 5 ml de agua destilada) durante 18 h a 28 °C con agitación 100  $\text{min}^{-1}$ . El control positivo se realizó en iguales condiciones para lo cual se inoculó 5  $\mu\text{l}$  en 3 ml de medio YPD líquido junto con 1 ml de vitamina C a una concentración 25 mg/ml (1,75 ml de vitamina C en 3,5 ml de agua destilada) y 50 mg/ml (2,5 ml de vitamina C en 2,5 ml de agua destilada), para inducir una respuesta antioxidante. En el caso del control negativo se inoculó 5  $\mu\text{l}$  de la dilución en 3 ml de medio líquido YPD, sin ningún ingrediente antioxidante y se dejó reposar bajo las mismas condiciones del microencapsulado y el control positivo.

Transcurridas las 18 h se recogieron las células mediante centrifugación a  $2700 \text{ min}^{-1}$ , durante 10 minutos, a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y se resuspendió el precipitado en 3 ml de PBS pH 7,4 y se determinó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO), hasta llegar a una absorbancia de 0,1 en cada uno de sus tratamientos.

Para la etapa de estrés oxidativo se añadió 1 ml peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en dos concentraciones de  $3 \text{ mmol}^{-1}$  y  $0,5 \text{ mmol}^{-1}$  para las concentraciones de microencapsulado y vitamina C. A continuación, fue incubado durante 60 min a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , para luego los oxidantes ser eliminados mediante centrifugación a  $2700 \text{ min}^{-1}$ , durante 10 min a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El pellet se resuspendió en 1 ml de medio líquido YPD y se sembraron 250  $\mu\text{l}$  de cada cultivo por triplicado para cada combinación de condición, en una placa de microtitulación de 96 pocillos. El crecimiento de *S. cerevisiae* se llevó a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en un espectrofotómetro UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO) con lector de placas de 96 pocillos a 600 nm durante 20 h con agitación antes de cada lectura.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis y discusión de resultados

##### 3.1.1 Caracterización del fruto del mamey

Los resultados de la caracterización son presentados en la Tabla 2. El promedio de la longitud de 10 frutos del mamey fue  $10,16 \pm 0,73$  cm, mientras el ancho fue de  $7,74 \pm 0,44$  cm. El peso fue de  $322,4 \pm 39,4$  g. El pH del jugo de mamey fue determinado triplicado con un valor de  $4,82 \pm 0,06$ , lo cual indicó que es una fruta ligeramente ácida, similar a los reportados por Cotrina et al. (2014).

Por otro lado, la humedad del fruto completo con semilla fue de 68,91 % y por ultimo un parámetro muy relacionado con la calidad del fruto es el contenido de sólidos solubles (Díaz et al., 2000), el cual fue de 18 grados Brix, según Gaona et al. (2008). Los valores del zapote mamey depende de su estado de maduración y se encuentran entre 9 y 36 grados Brix, lo que demuestra que es una fruta con altas concentraciones de azúcares.

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas del zapote mamey

Variable	Resultado
Longitud de la fruta	10,16 cm
Ancho de la fruta	7,74 cm
Peso de la fruta	322,4 g
pH de pulpa	4,82
Brix de pulpa	18
Humedad	68,91 %
Color	Amarillo ámbar
Olor	Agradable
Sabor	Ligeramente dulce
Textura	Pastosa

### 3.1.2 Extracción de carotenoides

Se midió la absorbancia de todos los tratamientos (Anexo 2) a una longitud de onda de 515 nm para el cálculo del contenido de carotenoides (Meléndez, 2017).

En la Tabla 3 se muestra el análisis de varianza realizado a los resultados del diseño.

**Tabla 3.** Análisis de Varianza para Carotenoides extraídos de zapote mamey

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A:Relación</b>	0,0234722	1	0,0234722	0,15	0,7061
<b>MV/VD</b>					
<b>B:Tiempo</b>	12,2513	1	12,2513	76,48	0,0000
<b>extracción</b>					
<b>AA</b>	9,11845	1	9,11845	56,92	0,0000
<b>AB</b>	5,45401	1	5,45401	34,05	0,0000
<b>BB</b>	12,2218	1	12,2218	76,29	0,0000
<b>Bloques</b>	0,00245185	2	0,00122593	0,01	0,9924
<b>Error total</b>	3,04373	19	0,160196		
<b>Total (corr.)</b>	42,1151	26			

Nota. MVVD= Relación de masa con disolvente

A un 95 % de confianza con la tabla ANOVA (Tabla 3) se obtuvo un valor de  $p=0,7061$  que es mayor a un nivel de significancia del 0,05 % por lo que se comprueba que la relación de la masa vegetal / volumen de disolvente (MV/VD) no influye significativamente en la respuesta experimental, y el valor de  $p=0,000$  define que el factor tiempo fue el que más tuvo influencia en la extracción, en base a los resultados experimentales analizados estadísticamente reportados en la Tabla 3.

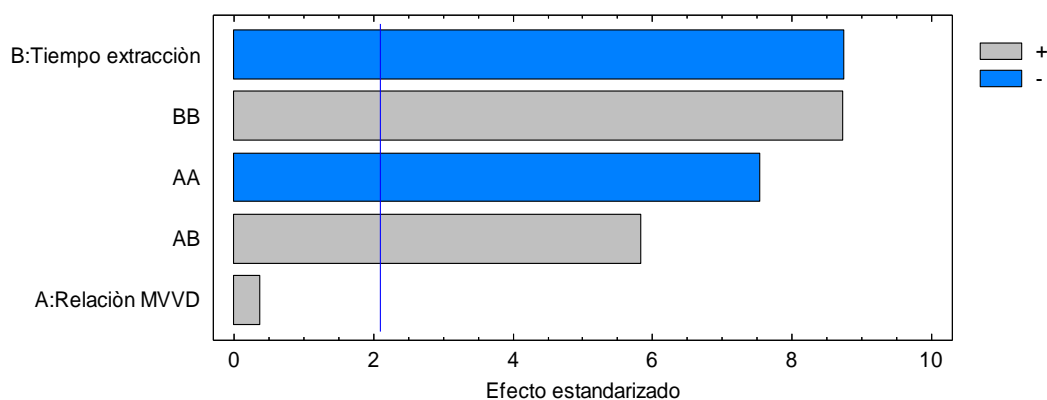
La Tabla 4 muestra los valores de respuesta óptima.

**Tabla 4.** Respuesta Óptima

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
<b>Relación MV/VD</b>	60,0	80,0	67,4
<b>Tiempo extracción</b>	30,0	90,0	30,0

El tiempo de extracción óptimo fue de 30 minutos con una relación masa-disolvente de 1:67 para extraer los carotenoides que se encontraron ligados a la muestra (Meléndez, 2017), obteniéndose un promedio de 14,70 g de carotenoides extraídos por cada 100 g de material vegetal seco.

La Figura 2 muestra el diagrama de Pareto estandarizado. Según Sales (2013), el uso de este diagrama permite identificar visualmente en una sola revisión tales minorías de características vitales a las que es importante prestar atención y de esta manera utilizar todos los recursos necesarios para llevar a cabo una acción correctiva.



*Figura 2 Diagrama de Pareto estandarizado para carotenoides extraído de zapote mamey*

Los factores tiempo y relación masa / disolvente (MV/VD) contribuyeron significativamente en la extracción de carotenoides. Como se muestra en la Figura 2, al analizar el diagrama de Pareto, se determinó que el tiempo de extracción fue el que más influencia tuvo en la extracción con un tiempo óptimo de 30 min. La relación de la masa vegetal / volumen de disolvente (MV/VD) para la extracción fue de 1 parte de masa vegetal

por 67 partes de disolvente, debido a que a mayor volumen de disolvente, permite la extracción de carotenoides en mayor cantidad.

El diseño experimental de superficie de respuesta  $3^2$  permite analizar la influencia de los dos factores estudiados, teniendo en cuenta que la relación masa vegetal / disolvente (MV/VD) como el tiempo de extracción tienen un efecto significativo como se muestra en la Figura 3, donde se relacionan los efectos principales en la extracción de carotenoides.

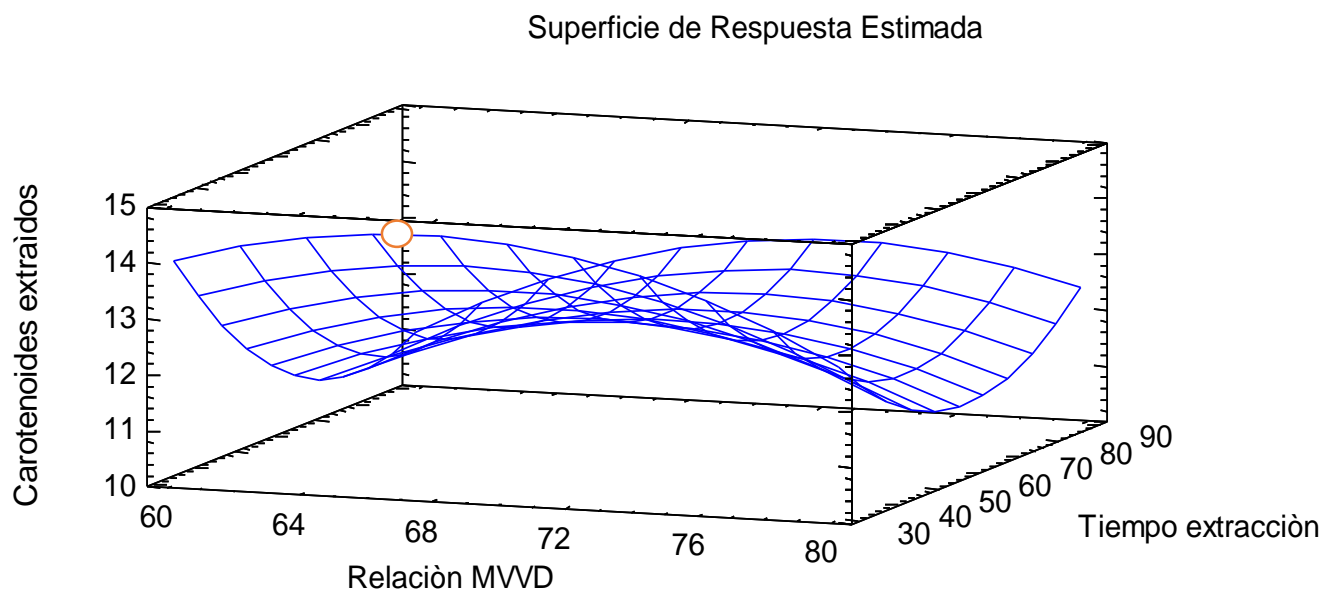


Figura 3 Gráfica de superficie de respuesta estimada de los efectos principales en la extracción de carotenoides. MV/VD= relación de masa el material vegetal con el disolvente etanol 96 %. Los carotenoides tienen una concentración en mg/100 g y el tiempo en minuto.

En la Figura 3 se observa que la relación MVVD óptima fue de 1:67, permitiendo la mayor extracción de carotenoides durante 30 minutos como tiempo de extracción óptimo. Este tiempo de extracción al parecer influye directamente en la cantidad de carotenoides extraídos del zapote mamey, permitiendo la saturación completa del disolvente en la extracción de los metabolitos.

### 3.1.3 Análisis de la eficiencia de microencapsulación

Con el uso de un mini Spray Dryer se microencapsuló mediante secado por aspersión, el cual es un método de microencapsulación ampliamente utilizado en la industria que

consiste en la dispersión de la sustancia a encapsular (concentrado de zapote mamey) en el agente encapsulante (maltodextrina y goma arábica), seguido de una atomización de la muestra en una cámara a alta temperatura, el solvente se evapora instantáneamente y el material activo queda atrapado dentro de una película de material encapsulante (Figuroa et al., 2016)

**Tabla 5.** Porcentaje de eficiencia de microencapsulación (% EM)

<b>Dilución 1:10</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración mg/L</b>	<b>% E.M</b>
<b>Agua</b>	1,11	2,80 ± 0,06	94,80 ± 0,1
<b>Etanol</b>	21,27	53,85 ± 0,18	

Por medio de una dilución 1:10 del microencapsulado en agua y etanol al 96 %, se obtuvieron las concentraciones de carotenoides presentes en la superficie y el interior del microencapsulado, con lo cual en la Tabla 5 se muestra las concentraciones que se determinaron por medio del cálculo para la eficiencia del microencapsulado, el mismo que fue del 94,80 %. Este valor obtenido de eficiencia de microencapsulación es cercano al porcentaje de eficiencia de 96,21 % obtenido por Fiallos (2019), en la microencapsulación de licopeno con el uso de maltodextrina y goma arábica. Según Luna et al. (2016) la correcta elección del material encapsulante es muy importante, ya que influye en la eficiencia de la encapsulación y la estabilidad de la microcápsula.

### **3.1.4 Análisis por espectrofotometría infrarroja FT-IR**

En base a un rango espectral de 4360 cm<sup>-1</sup> a 760 cm<sup>-1</sup> y con un porcentaje de transmitancia entre 40 y 110 % se analizaron las muestras del concentrado de carotenoides, el microencapsulado y la mezcla polimérica. La espectrofotometría infrarroja tiene sus bases físicas en la vibración molecular y esto ofrece muchas posibilidades en el análisis de compuestos de origen biológico (Castorena et al., 2011).

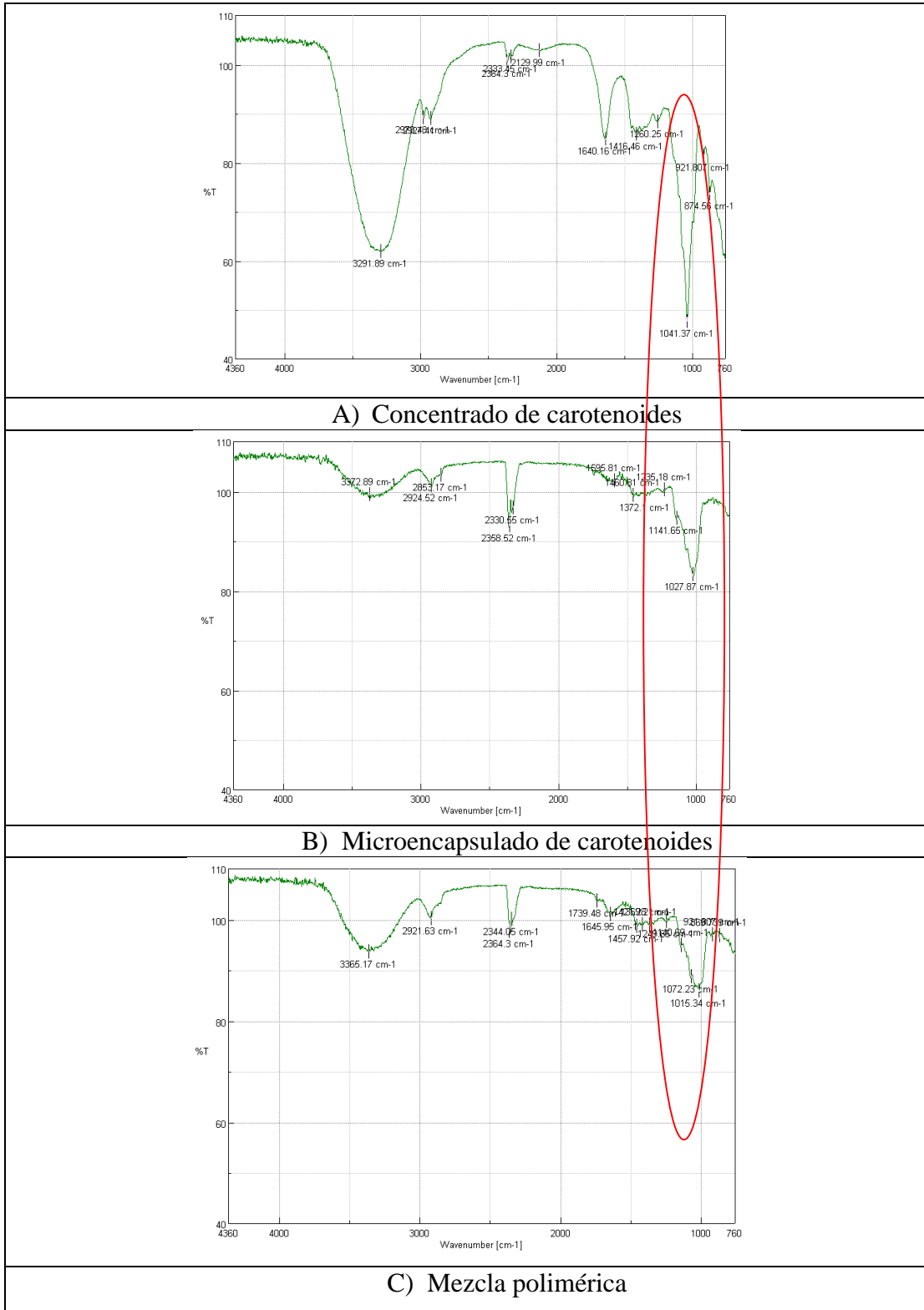


Figura 4. Espectrofotometría infrarrojo FT-IR para comprobar la eficiencia del microencapsulado. A) Espectro del concentrado de carotenoides; B) Espectro del microencapsulado de carotenoides; C) Espectro de la mezcla polimérica



La característica estructural más notoria en los carotenoides es el sistema de dobles enlaces conjugados, responsable de su color, reactividad y forma, así como de su papel en procesos de transferencia de energía (Meléndez, 2017). Los picos más significativos dentro del concentrado sin microencapsular fueron a  $1041,37\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4A) y corresponden a las bandas pertenecientes a los grupos (-C-C) de carbohidratos de  $1082 - 1034\text{ cm}^{-1}$  (Bolio et al., 2013). El pico  $1041,37\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4B y C) se encuentran minimizados una vez que el concentrado de mamey se microencapsuló con maltodextrina y goma arábica, debido a que la mezcla polimérica recubre estos grupos funcionales, al igual que los enlaces dobles (-C=C) en  $1600$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  (Castañeda et al., 2013), formando una armadura para proteger a los carotenoides, lo que demuestra la efectividad del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión.

### **3.1.5 Actividad antioxidante *in vitro* del microencapsulado**

El consumo de antioxidantes en la dieta diaria tiene un aporte importante al organismo. Bajo este contexto, los métodos de microencapsulación de antioxidantes mediante secado por aspersión permiten obtener microcápsulas como un producto totalmente seco y estable, con el fin de puedan liberar su contenido de carotenoides a velocidades controladas bajo condiciones específicas a la vez que protege al compuesto encapsulado de la luz y el oxígeno (Arteaga et al., 2016)

Este ensayo permitió evaluar la actividad antioxidante del concentrado y el microencapsulado del zapote mamey, en base a la reducción del radical libre DPPH en la presencia de compuestos antioxidantes. Según Guija (2015), este radical libre es susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes a tras de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.

Para Bobo et al. (2015), la cuantificación de la actividad antioxidante se basa en la decoloración del reactivo a aproximadamente  $515\text{ nm}$ . En la Tabla 6 se muestra el potencial antioxidante que posee zapote mamey en equivalentes en Trolox.

**Tabla 6.** Resultados de inhibición por DPPH

Muestras	Diluciones	Absorbancias	% de Inhibición	μmol equivalentes de Trolox l <sup>-1</sup>
Concentrado	1/200	0,410	33,84	253,21
Microencapsulado	1/200	0,347	45,34	385,19

Para calcular el porcentaje de inhibición de DPPH se usó la ecuación 6, detallada en la metodología, y se graficó frente a las μmol Trolox (50 – 500 μmol<sup>-1</sup>) que se muestra en el Anexo 4. En este sentido, se obtuvo la siguiente ecuación de recta  $y = 0,0871x + 11,788$  junto con un  $R^2 = 0,99$ .

En base a la curva de calibración Trolox se determinó el porcentaje de inhibición de DPPH para las muestras diluidas de 33,84 % para el concentrado y de 45,34 % para el microencapsulado y con una relación a la concentración de μmol equivalentes de Trolox se obtuvo valores de 253,21 μmol<sup>-1</sup> y 385,19 μmol<sup>-1</sup> respectivamente (Tabla 6) y que dan como referencia el potencial antioxidante de cada muestra.

### 3.1.6 Actividad antioxidante *in vivo* del microencapsulado

Para analizar la actividad antioxidante del microencapsulado de *P. sapota* se utilizó el protocolo sugerido por Peláez et al. (2016).

Como se muestra en la Figura 5 y 6 existen diferentes curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* después de las 24 h de incubación. Dos corresponden al microencapsulado a 50 mg/ml y 25 mg/ml, con la adición del peróxido de hidrógeno a concentraciones de 3 mmol<sup>-1</sup> y 0,5 mmol<sup>-1</sup> respectivamente. En adición a esto tenemos las dos curvas con vitamina C en concentraciones de 50 mg/ml y 25 mg/ml con la adición del peróxido a 3 mmol<sup>-1</sup> y 0,5 mmol<sup>-1</sup> cada uno. Por otra parte, tenemos la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* con la adición del peróxido al 3 mmol<sup>-1</sup> y 0,5 mmol<sup>-1</sup> y finalmente otra curva de *S. cerevisiae* sin adición de ningún tratamiento. Las absorbancias fueron medidas a una longitud de onda de 600 nm debido a que la medida de la Absorbancia es una forma rápida y fácil de estimar el crecimiento de la biomasa (Rodríguez et al. 2018).

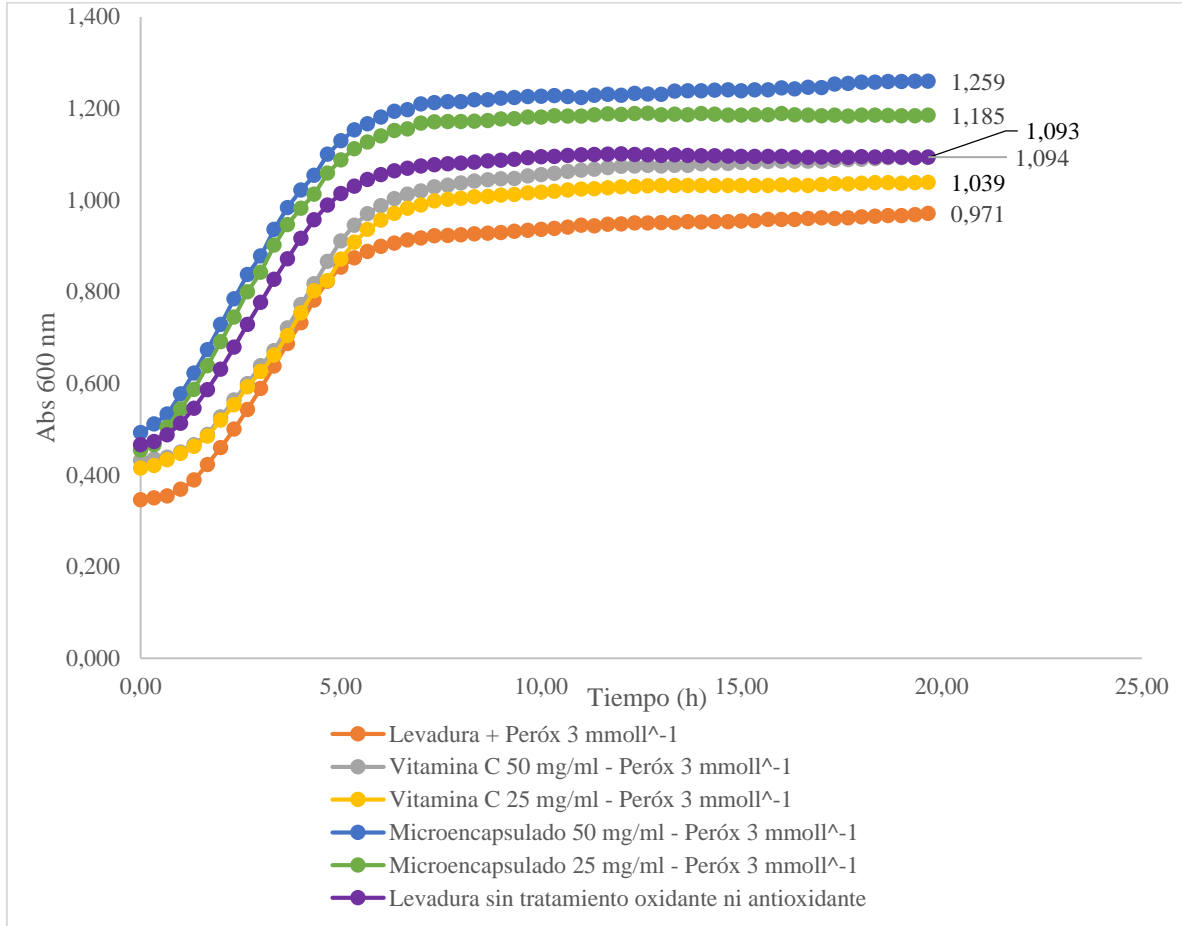


Figura 5 Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* frente a un estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  3 mmol l<sup>-1</sup>.

Nota: Mediciones cada 20 minutos durante 18 horas.

La curva generada por el crecimiento de *S. cerevisiae* con el microencapsulado a 50 mg/ml y 25 mg/ml junto con el peróxido de hidrógeno a concentración de 3 mmol l<sup>-1</sup> tuvo un fase de acondicionamiento y crecimiento buena, ya que trascurridas las 20 horas de incubación llegó a una absorbancia de 1,259 y 1,185 respectivamente, comparado con la levadura sin antioxidante y con peróxido de hidrógeno al 3 mmol l<sup>-1</sup> donde su absorbancia fue 0,971, siendo los antioxidantes microencapsulados de zapote mamey capaces de secuestrar especies reactivas del oxígeno producidas por el peróxido de hidrógeno (Sánchez et al. 2005)

La Figura 6 a diferencia de la Figura 5, se relaciona con una concentración de 0,5 mmol l<sup>-1</sup> de peróxido de hidrógeno con la que se comparó las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae*

con el microencapsulado, donde se puede apreciar una mayor absorbancia por parte del microencapsulado a 50 mg/ml y 25 mg/ml de 1,335 y 1,301 respectivamente, por lo cual se mantiene la tendencia en las curvas de crecimiento de la Figura 5 y 6 con respecto al potencial antioxidante de zapote mamey ante el peróxido de hidrógeno de este ensayo.

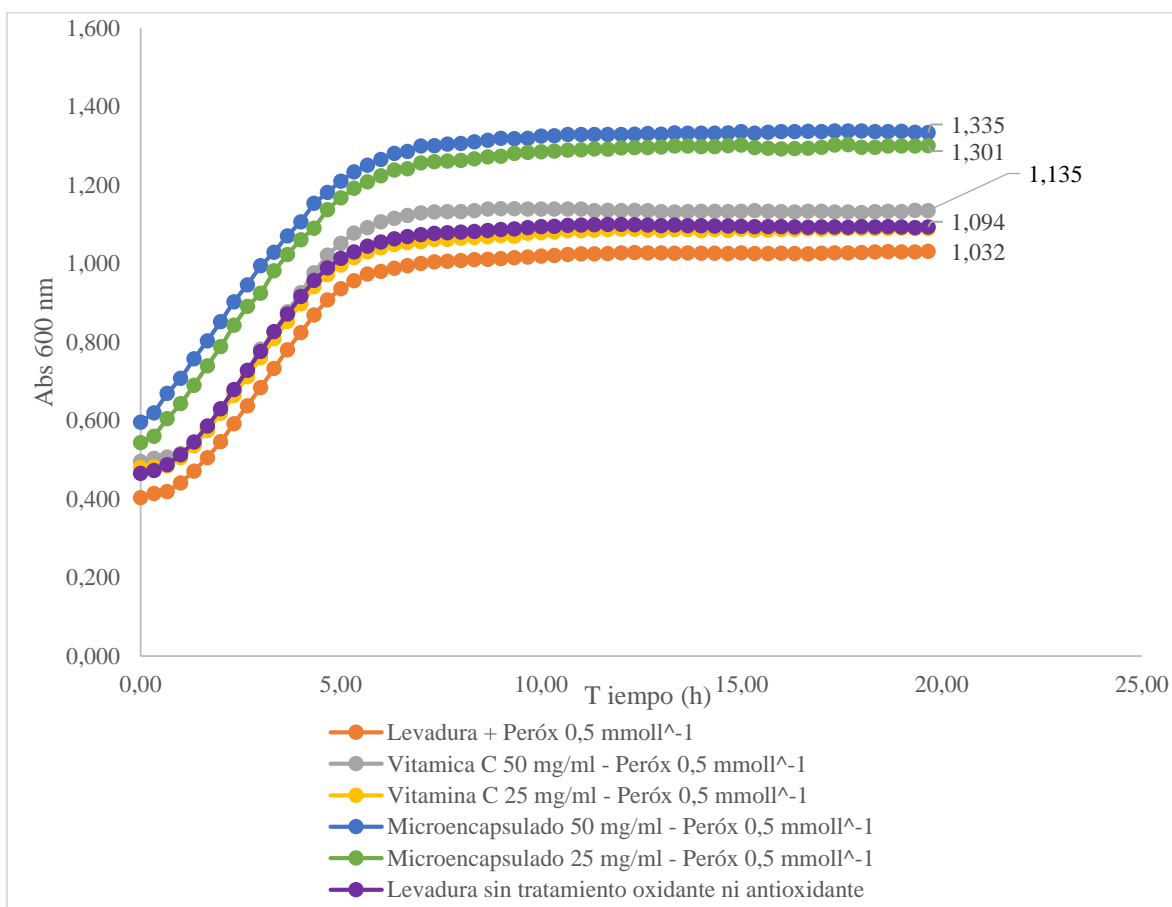


Figura 6 Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* frente a un estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$   $0,5\text{ mmoll}^{-1}$ .

Nota: Mediciones cada 20 minutos durante 18 horas.

### 3.2 Verificación de hipótesis

Por medio del análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*.

$H_0 \neq 0$  Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$  Se acepta la hipótesis alternativa, por lo que se considera que los factores analizados si influyen en la actividad antioxidante.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- Se caracterizó la fruta de zapote mamey utilizadas para la extracción de carotenoides cuyo tamaño promedio fueron de 10,16 cm de alto y 7,74 cm de ancho, con un peso promedio de la fruta de 322,4 g y con una humedad del 68,91 %; además de un pH ligeramente acidó de 4,82 del jugo extraído de la pulpa con 18 grados Brix.
- Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de carotenoides para zapote mamey aplicando un diseño experimental de superficie de respuesta  $3^2$ , del cual por medio de un análisis estadístico se estableció que la mejor combinación de factores fue una relación de 1 parte de masa por cada 67 partes de disolvente etanol 96 %, con un tiempo de extracción de 30 min, lo que permitió alcanzar una concentración máxima de 14,70 g de carotenoides por cada 100 g de material vegetal seco extraído.
- Se microencapsuló el extracto concentrado de zapote mamey mediante secado por aspersion, con maltodextrina y goma arábica, obteniéndose una eficiencia de microencapsulación de 94,8 %, se demostró mediante espectrofotometría infrarroja FT-IR que los carotenoides fueron protegidos por la mezcla polimérica.
- Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* mediante una prueba de DPPH obteniéndose valores equivalentes de Trolox de  $253,21 \mu\text{mol}^{-1}$  para el extracto concentrado y de  $385,19 \mu\text{mol}^{-1}$  para el microencapsulado. Este efecto antioxidante fue corroborado mediante la prueba *in vivo* en *S. cerevisiae* en la que el microorganismo tuvo un mayor crecimiento con el microencapsulado a 50 mg/ml, alcanzándose absorbancias máximas de 1,259 y 1,335 para peróxido de hidrogeno  $3 \text{ mmol}^{-1}$  y  $0,5 \text{ mmol}^{-1}$  respectivamente, en comparación con la curva de crecimiento de la levadura sin el microencapsulado, incluso superando los valores alcanzados por la vitamina C.

## 4.2 Recomendaciones

- Evaluar la extracción usando otros disolventes como metanol o acetona.
- Utilizar cepas de *S. cerevisiae* certificadas con el fin de evitar posibles variaciones entre levaduras aisladas de manera tradicional.
- Variar las concentraciones de vitamina C, peróxido y el microencapsulado en la prueba *in vivo* para tener más claro el efecto antioxidante en *S. cerevisiae*.
- Realizar ensayos *in vivo* en animales de laboratorio para determinar el poder antioxidante de zapote mamey.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arteaga, A., & Arteaga, H. (2016). Optimization of the antioxidant capacity, anthocyanins and rehydration in powder of cranberry (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulated with mixtures of hydrocolloids. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 191–200. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.05>
- Alia, T., Colinas, M., Martínez, M., Soto, & R., (2002). Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8(2): 263-281.
- Avello, M., & Suwalsky, M., (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, núm. 494, pp. 161-172. Chile. Retrieved from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=32849410>
- Alia, T., Villanueva, R., Pelayo, C., Colinas, M., Lopez, V., & Bautista, S., (2007). Postharvest physiology and technology of sapote mamey fruit (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). *Postharvest Biology and Technology*. 45, 285–297. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.12.024
- Avello, R., & Seisdedo, A. (2003). El procesamiento estadístico con R en la investigación científica. *MediSur*, 15(5), 583–586. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-897X2017000500001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2017000500001)
- Azurdia, C. (2006). *Tres especies de zapote en America tropical (Pouteria campechiana, P. sapota y P. viridis)*.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bolio-López, G. I., Veleva, L., Valadez-González, A., & Quintana-Owen, (2013). Weathering and Biodegradation of Polylactic Acid Composite Reinforced With Cellulosewhiskers. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 143–153.



- Castorena, J., Rojas, M., Delgado, R., & Robles de la Torre, R. (2011). Análisis de Pulpa y Aceite de Aguacate con Espectroscopia Infrarroja. *Conciencia Tecnológica*, (42), 5–10.
- Castañeta, H., Gemio, R., Yapu, W., & Nogales, J., (2011). Microencapsulación, un Método para la Conservación de Propiedades Fisicoquímicas y Biológicas de Sustancias Químicas. *Revista Boliviana de Química*, 28(2), pp. 135-140. Bolivia
- Castañeda-Pérez, E., Osorio-Revilla, G. I., Gallardo-Velázquez, T., & Proal-Nájera, J. B. (2013). Uso de ftir-hatr y análisis multivariable para el seguimiento de la degradación de compuestos bioactivos durante el secado de pimienta roja. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(2), 193–204.
- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C., (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*, 42(2).
- Cotrina, G. S., Haro, I. R., & Torres, P. (2014). *Potencial industrial de la pulpa de Pouteria sapota para la preparación de nectar de calidad Industrial potential of Pouteria sapota pulp for preparing quality nectar*. 34(2), 5–12.
- Diaz-Perez, J. C., Bautista, S., & Villanueva, R. (2000). Quality changes in sapote mamey fruit during ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology*, 18(1), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(99\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(99)00062-9)
- Diaz, J., Baustita, S., Villanueva, R., López, G., (2003). *Postharvest Biology and Technology* 28. Mexico. 199-202.
- Domínguez, B., Martínez, A., & Alia, Tl., (2010). Caracterización de la maduración en ecotipos de zapote mamey (pouteria sapota). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11(2), pp. 122-129. Retrieved from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=81315809003>
- Elhadi, M., Gutiérrez, F., & Arvizu, C., (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (Pouteria sapota Jacq. H.E. Moore & Stearn) fruit. *Food Research International*. 44, 2175–2181.
- Figuroa, P. M., Ceballos, M. A., & Hurtado, A. M. (2016). Microencapsulação por secagem por atomização de óleo de amora (Rubus glaucus) extraído com CO2

- supercrítico. *Revista Colombiana de Química*, 45(2), 39–47.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.57481>
- Fiallos, H. (2019). *Extracción y microencapsulación, de carotenoides con actividad antioxidante a partir de Daucus carota* (Técnica de Ambato). Recuperado de:  
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29998/1/BQ%20191.pdf>
- García, B., Saldaña, A., & Saldaña, L., (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 12(2), pp. 187-196. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Cuba. Retrieved from:  
<http://redalyc.org/articulo.oa?id=180427525006>
- Gaona-García, A., Alia, T., López, V., Andrade, M., Colinas, M., & Villegas, O., (2008). *CARACTERIZACIÓN DE FRUTOS DE ZAPOTE MAMEY (Pouteria sapota) EN EL SUROESTE IN THE SOUTHWEST REGION OF MORELOS*. 14(1), 41–47.
- González, R., Pérez, J., & Urbina, N., (2014). Efecto de la microencapsulación sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas del yogurt blando, *Inf. tecnol.* 25(6) La Serena. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000600007>
- Huerta, M., Ortega, M., Cobos, M., Herrera, J., Díaz, A., & Guinzberg, R., (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia*, 30(12), pp. 728-734. Retrieved from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=33911102>
- Kushi, L., Doyle, C., McCullough, M., & Rock, C., (2012). American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: Reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. 62(1):30-67.
- Luna, J. J., López Fuentes, J. M., Jiménez González, O., & Luna Guevara, L. (2016). Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión / Microencapsulation of some bioactive compounds through spray drying. *CIBA Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(10), 39. <https://doi.org/10.23913/ciba.v5i10.56>

- Martínez, S., González, J., J, Culebras., & M, Tuñón. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp. XVII* (6) 271-278. Retrieved from: [https://www.researchgate.net/profile/Javier\\_Gonzalez-Gallego/publication/10961859\\_Flavonoids\\_Properties\\_and\\_antioxidizing\\_action/links/0deec52a6b0057f327000000/Flavonoids-Properties-and-antioxidizing-action.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Javier_Gonzalez-Gallego/publication/10961859_Flavonoids_Properties_and_antioxidizing_action/links/0deec52a6b0057f327000000/Flavonoids-Properties-and-antioxidizing-action.pdf)
- Meléndez-Martínez, A. J. (2017). *Carotenoides en agroalimentación y salud*.
- Mercuri, R., Nakamura, L., Gentil, T., López, E., & dos Santos Dias, C., (2016). Genotype selection of *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn, under a multivariate Framework. *Acta Agronómica*, 65(3), pp. 312-317. Retrieved from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=169944104016>
- Meléndez, A., Vicario, I., & Heredia, F., (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. 57(2), España.
- Moss, R. (2006). Mangosteen: A friendly sceptic looks at mangosteen from cancerdecisions.com newsletter. Retrieved from: <http://chetday.com/manaosteen.html>.
- Monllor, P. (2007). *Caracterización de microencapsulados aplicados sobre materiales textiles*. Universidad Politécnica de Valencia Universidad, 1–102.
- Nava, E., Michelena, G., Iliná, A., & Martínez, J., (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia*, 23(66), pp. 64-70. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. Retrieved from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=67446014009>
- P., Peláez Soto, A., & Patricia Roig Montoya José Vicente Gil Ponce Valencia, D. (2016). Universitat de València, Validación funcional de extractos Polifenólicos de cacao mediante ensayos in vivo con organismos modelo tesis doctoral. Retrieved from: <https://core.ac.uk/download/pdf/75988884.pdf>

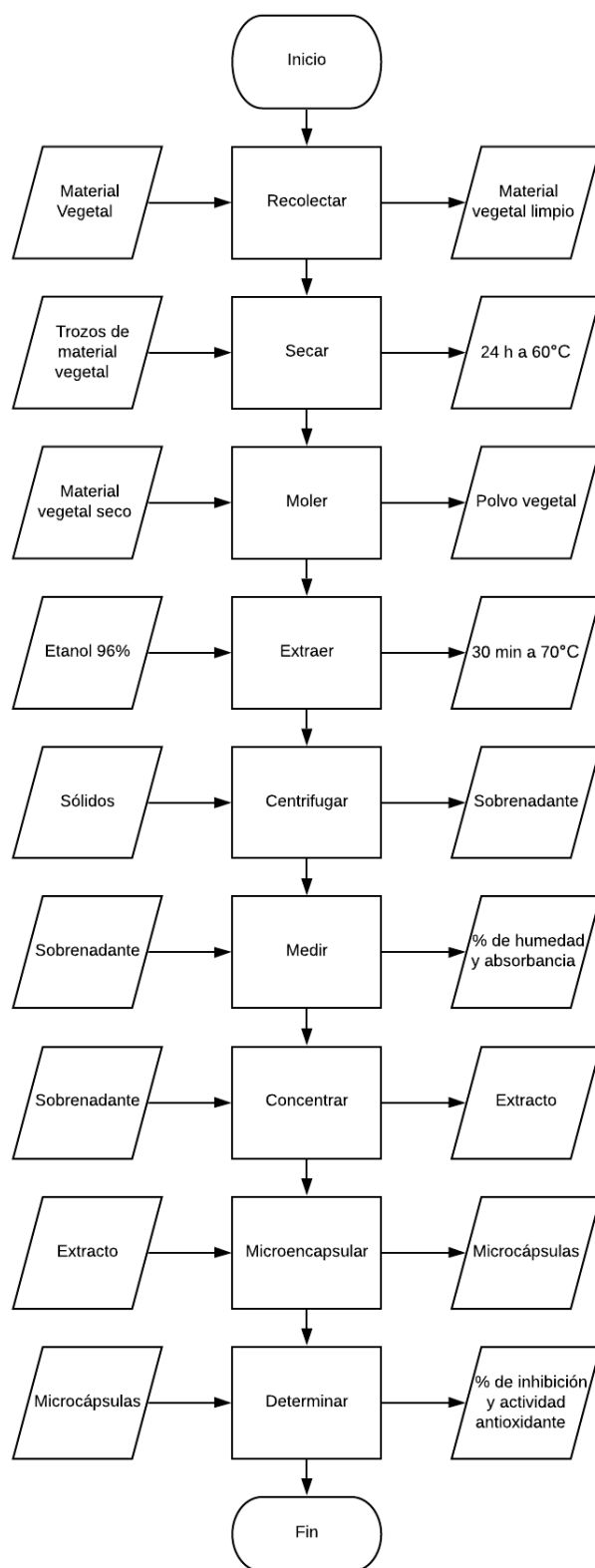
- Paulín, K. V., Alvarado Sánchez, B., & Munguía, A. R. (2015). Historia del mamey *Pouteria sapota*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 1–9. Retrieved from: [www.reibci.org](http://www.reibci.org)
- Ramos, F., Alia, Tl., López, V., Colinas, M., Acosta, C., Tapia, A., & Villegas, O., (2009). Storage of sapote mamey fruits [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn] in modified environment. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*, 15(1), Chapingo. Retrieved from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2009000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2009000100004&script=sci_arttext)
- Ramos, M., Batista, C., Gómez, B., & Zamora, A., (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*, 8(1), pp. 7-15. México. Retrieved from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=14280102>
- Rodríguez, D., (1999). Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados. *LATINFOODS para América del Sur*. Brasil.
- Rodríguez Best, C., Cjuno Huanca, J. A., & Ceroni Galloso, M. (2018). Influencia de la concentración de Se(IV) en la viabilidad celular durante el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 84(2), 228–238.
- Rosa, M. (2016). Evaluación mediante espectrofotometría UV-VIS derivativa de la degradación del 2-clorofenol. *Revista Cubana de Química*, 25(3), 318–327.
- Silva, D., Simeoni, L., & Silveira, D. (2009). Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian. Journal of Pharmacognosy*. 19(2A): 501-509.
- Sales, M. (2013). Diagrama de pareto. *EALDE Business School*, 1–8. Retrieved from <http://www.gestiopolis.com/recursos/documentos/fulldocs/eco/diagramapareto.htm> %0Ahttps://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44144377/Diagramde\_pareto.pdf

- Sauri E., Tamayo E. (1997). Calidad y vida útil de dos cultivares de mamey (pouteria sapota) cosechados en Yucatán, México. Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, Yucatán, México.
- Sauri, E., Tamayo, E., Díaz, J., García, K., Vargas, L., González, S., & Centurión, A., (2007). Calidad y vida útil de dos cultivares de mamey (pouteria sapota) cosechados en Yucatán, México. Instituto Tecnológico de Mérida, México. Retrieved from: [https://datospdf.com/download/calidad-y-vida-util-de-dos-cultivares-de-mamey-pouteria-sapota-cosechados-en-yucatan-mexico-\\_5a4c1537b7d7bcab6702c713\\_pdf#](https://datospdf.com/download/calidad-y-vida-util-de-dos-cultivares-de-mamey-pouteria-sapota-cosechados-en-yucatan-mexico-_5a4c1537b7d7bcab6702c713_pdf#)
- Sánchez Lamar, Á., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Gensabella, G., & De Salvia, R. (2005). Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(2), 0–0.
- Sánchez, A., Flores, L., Langley, E., Martin, R., Maldonado, G., & Sánchez, S., (1999). Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. *Asociación Latinoamérica de microbiología*. 41:175-191.
- STATGRAPHICS Centurion XVIII. 2019. Retrieved from: <https://statgraphics.net/>
- Tejascal, A., Soto, R., Colinas, M., & Martínez, M., (2005). Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de Zapote Mamey. *Revista Chapingo serie horticultura*, 11(2), pp. 225-231.
- Torres, A., Salinas, Y., valle, S., & Alia, T., (2011). Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*pouteria sapota*) fruit in posthaver. *Food Re Int*, 44(1), 1956-1961. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.045.
- Tropicos. *Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore y Stearn. Retrieved from: <https://www.tropicos.org/>
- Venero, J., (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil*, 31 (2) Ciudad de la Habana. Retrieved from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572002000200009&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572002000200009&script=sci_arttext&lng=pt)

- Villena, M., Hernández, M., Lara, G., & Martínez, R., (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm*, 50(1), Pag. 43-50. Retrieved from: <http://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/4884/4691>
- Villegas-Monter, A., Escobar-Sandoval, C. M., Arrieta-Ramos, G., & Berdeja-Arbeu, R. (2016). Zapote Mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn], diversidad y usos. *Agroproductividad*, 9(4), 47–54.
- Vitale, A., Bernatene, E., & Pomilio, A., (2010). Carotenoids in chemoprevention: Lycopene. *Bioquímica Clínica. Rev. chil. nutr.* 42(2), <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Vargas García, C. A., García Sánchez, C., Arguello Fuentes, H., & Torres Sáez, R. G. (2013). Balance de Flujos Metabólicos en *Saccharomyces cerevisiae* basado en Compartimentalización Intracelular. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 18. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41263>
- Villena, M., Morales, M., Gallardo, V., & Ruiz, M., (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*. 50(1): 43-50. Retrieved from: <https://pdfs.semanticscholar.org/a611/a95727500e42e87a72b69a5b0f85cecc6efa.pdf>
- Youngson, R. (2003). Antioxidantes y radicales libres. España. Editorial EDAF, S. A..
- Zamora, J., (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1), Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología. Chile. Retrieved from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=46934102>

## ANEXOS

### Anexo 1. Resumen del proceso experimental



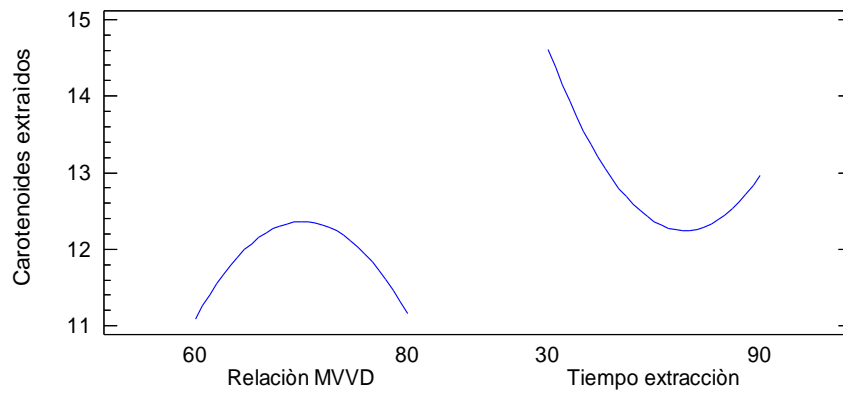
Anexo 2. Datos obtenidos para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de carotenoides con distintos tratamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Material Vegetal (g)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Con. mg/L</b>	<b>% Humedad</b>	<b>Sólidos totales</b>	<b>Masa de sólido extraído</b>	<b>Con. de carotenoides mg/100g</b>
R: 1/60	0,833	0,2782	0,806	99,490	0,510	0,245	15,811
t: 30 min	0,833	0,2775	0,804	99,490	0,510	0,245	15,772
	0,833	0,2765	0,801	99,343	0,657	0,315	12,199
R: 1/60	0,833	0,3095	0,897	99,210	0,790	0,363	11,356
t: 60 min	0,833	0,3073	0,891	99,267	0,733	0,337	12,152
	0,833	0,3051	0,884	99,238	0,762	0,350	11,611
R: 1/60	0,833	0,3699	1,072	98,993	1,007	0,423	10,647
t: 90 min	0,833	0,3688	1,069	99,001	0,999	0,420	10,701
	0,833	0,3671	1,064	98,993	1,007	0,423	10,567
R: 1/70	0,714	0,2500	0,725	99,478	0,522	0,251	13,882
t: 30 min	0,714	0,2561	0,742	99,514	0,486	0,233	15,274
	0,714	0,2521	0,731	99,496	0,504	0,242	14,499
R: 1/70	0,714	0,2570	0,745	99,363	0,637	0,293	11,782
t: 60 min	0,714	0,2571	0,745	99,417	0,583	0,268	12,782
	0,714	0,2594	0,752	99,390	0,610	0,281	12,326
R: 1/70	0,714	0,2831	0,821	99,385	0,615	0,258	13,243
t: 90 min	0,714	0,2804	0,813	99,372	0,628	0,264	12,942
	0,714	0,2824	0,819	99,378	0,622	0,261	13,160
R: 1/80	0,625	0,2141	0,621	99,492	0,508	0,244	12,216
t: 30 min	0,625	0,2147	0,622	99,492	0,508	0,244	12,250
	0,625	0,2175	0,630	99,551	0,449	0,216	14,041
R: 1/80	0,625	0,2215	0,642	99,376	0,624	0,287	10,289
t: 60 min	0,625	0,2214	0,642	99,417	0,583	0,268	11,008
	0,625	0,2239	0,649	99,396	0,604	0,278	10,745
R: 1/80	0,625	0,2519	0,730	99,400	0,600	0,252	12,169



t: 90 min	0,625	0,2521	0,731	99,484	0,558	0,217	14,161
	0,625	0,2525	0,732	99,484	0,558	0,217	14,184

### Anexo 3. Efectos principales para carotenoides extraídos.



### Anexo 4. Curva de Calibración del Trolox

