



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



Extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de las antocianinas presentes en las flores de *Hibiscus sabdariffa* cultivadas en el cantón Milagro, provincia del Guayas

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a 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 y Biotecnología.

Autor: Bryan Iván Núñez Cazares

Tutor: Ph. D. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph. D. 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 de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 27 de julio del 2022

Ph. D. Orestes Darío López Hernández

C.I 175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Bryan Iván Núñez Cazares manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Bryan Iván Núñez Cazares

C.I. 180489926-6

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 y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dra. Nelly Esther Flores Tapia

C.I: 171625330-5

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

C.I: 180357158-5

Ambato, 30 de agosto del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso de este trabajo de titulación 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 trabajo de titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



Bryan Iván Núñez Cazares

C.I. 180489926-6

AUTOR

DEDICATORIA

A mi Abba Padre

Que desde que fui concebido en el vientre de mi mamá ya me amó y me bendijo con su Santo Espíritu, para que ahora sea más que Vencedor.

A mis padres

Iván y Guadalupe, que han sido esas guías primordiales en el transcurso de mi vida, instruyéndome y enseñándome desde que era niño hasta ahora que ya soy adulto, aquí les presentó el fruto de sus esfuerzos.

A mi hermano

Rodrigo, mi mejor amigo y compañero fiel de toda la vida, gracias por tu paciencia y templanza al tratar de entenderme en los momentos más difíciles que hemos atravesado.

A mis ángeles

Marietta y Rolando, que siempre estuvieron para mí en todo momento, me apoyaron y enseñaron lo que más valoro en esta vida, que es esa pasión por el servicio a Dios.

AGRADECIMIENTO

Gracias a mis Padres que, por sus incontables esfuerzos y sacrificios, me pudieron regalar la educación que ahora conllevo, y ser el hombre que ahora Soy, Dios me los guarde y proteja siempre. A pesar de las dificultades que me miraron atravesar nunca declinaron y estuvieron a mi lado susurrándome que nunca me rindiera, esto no sería posible si no fuera por ese corazón inmenso que tienen para sus hijos.

A mi tutor Ph. D. Orestes López, por su ayuda en cada paso del desarrollo de mi tesis, su instrucción temprana, paciencia, confianza y su inmensa amistad que lo caracteriza a cualquier parte que vaya.

A mis amigos, Esteban A, Diego R, Diego T, Natasha V, Cynthia M y Daniel C, gracias por estar en esos momentos cuando todo se me venía encima y sus consejos daban alivio a mi corazón.

A la Universidad Técnica de Ambato y los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología quienes han aportado grandemente en mi desarrollo profesional.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

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
AGRADECIMIENTO	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE ECUACIONES	XIII
INDICE DE ANEXOS.....	XIII
RESUMEN EJECUTIVO	XV
ABSTRACT.....	XVI

CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	1
1.1.1 Descripción de la planta de Flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	1
1.1.1.1 Generalidades	1
1.1.1.2 Origen.....	2
1.1.1.3 Clasificación Taxonómica.....	2
1.1.1.4 Distribución Geográfica	3

1.1.1.5	Descripción Botánica	4
1.1.1.6	Composición química y valor nutricional	4
1.1.2	Antocianinas	9
1.1.2.1	Generalidades	9
1.1.2.2	Estructura Química.....	9
1.1.2.3	Factores que determinan la estabilidad de las antocianinas	11
1.1.2.3.1	Efecto del pH	11
1.1.2.3.2	Efecto de la temperatura	12
1.1.2.3.3	Efecto de la luz	12
1.1.2.3.4	Efecto del oxígeno	12
1.1.2.3.5	Efecto de las enzimas.....	13
1.1.2.4	Propiedades funcionales de las antocianinas	13
1.1.2.5	Importancia de las antocianinas.....	14
1.1.2.6	Extracción de antocianinas	14
1.1.3	Microencapsulación	15
1.1.3.1	Técnicas de microencapsulación	15
1.1.4	Importancia de la microencapsulación	17
1.1.5	Actividad antioxidante.....	17
1.2	HIPOTESIS	18
1.2.1	Hipótesis Nula.....	18
1.2.2	Hipótesis Alternativa	18
1.3	SEÑALIZACIÓN DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	18
1.3.1	Variables dependientes	18
1.3.2	Variables independientes	18
1.4	OBJETIVOS	18
1.4.1	Objetivo General.....	18
1.4.2	Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO II	20
METODOLOGÍA	20
2.1 MATERIALES	20

2.1.1 Materia Prima	20
2.1.2 Materiales de Laboratorio	20
2.1.3 Equipos	21
2.1.4 Reactivos.....	22
2.2 MÉTODOS	22
2.2.1 Trabajo de campo.....	22
2.2.1.1 Recolección de la materia prima (flores).....	22
2.2.2 Trabajo de Laboratorio	23
2.2.2.1 Preparación del material vegetal	23
2.2.2.2 Obtención del extracto de antocianinas.....	23
2.2.2.3 Determinación de los grados Brix	24
2.2.2.4 Determinación de sólidos totales.....	24
2.2.2.5 Determinación de la concentración de antocianinas	25
2.2.2.5.1 Análisis por espectrofotometría.....	25
2.2.2.5.2 Análisis por pH diferencial	26
2.2.2.6 Determinación del contenido de antocianinas.....	27
2.2.2.7 Microencapsulación de antocianinas mediante secado por aspersión con maltodextrina.....	27
2.2.2.8 Análisis de Espectrofotometría Infrarroja FT-IR	29
2.2.2.9 Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	29
2.2.2.10 Determinación de la actividad antioxidante	30
2.2.2.10.1....Capacidad antioxidante mediante el método de DPPH (<i>In vitro</i>)	30
2.2.3 Análisis estadístico	31
2.2.3.1 Diseño experimental.....	31
CAPÍTULO III.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1 DETERMINACIÓN DEL MEJOR DISOLVENTE PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS	33
3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL LÍQUIDO	35
3.3 MICROENCAPSULACIÓN DE ANTOCIANINAS.....	39

3.3.1	Análisis estadístico de comparación de concentraciones	40
3.4	ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE MICROENCAPSULACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS.....	41
3.5	ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA FTIR	42
3.6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (<i>IN VITRO</i>).....	44
3.7	VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS	46
CAPÍTULO IV		47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		47
4.1	CONCLUSIONES.....	47
4.2	RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		49
ANEXOS		59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Identificación Taxonómica de la Flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	2
Tabla 2 Composición proximal de cálices de Jamaica (g/100 g de materia seca)	6
Tabla 3 Componentes químicos de la Hibiscus sabdariffa L.	7
Tabla 4 Contenido en compuestos polifenólicos de los cálices de la flor de Jamaica (g/100 g de materia seca).....	8
Tabla 5 Capacidad antioxidante de los cálices de la Flor de Jamaica y algunos subproductos vegetales.....	8
Tabla 6 Procesos para la obtención de componentes microencapsulados	16
Tabla 7. Materiales proceso experimental.....	20
Tabla 8 Materiales de vidrio empleados para el proceso experimental	21
Tabla 9 Equipos empleados para el proceso experimental	21
Tabla 10 Estructura del diseño experimental 2 ² (A x B).....	32
Tabla 11 Distribución de los tratamientos	32
Tabla 12 Resultados de la eficiencia de microencapsulación	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Planta de Flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	3
Figura 2 Antocianos presentes en la Flor de Jamaica	5
Figura 3 Estructura química y sustituyentes de las antocianinas	10
Figura 4 Tonalidad de las antocianinas a distintos niveles de pH	11
Figura 5 Diagrama de cajas y bigotes normalizado por la influencia de los disolventes aplicados en la extracción de antocianinas de Flor de Jamaica.	34
Figura 6 Diagrama de interacción del material vegetal / volumen de disolvente y el tiempo de extracción de antocianinas de Flor de Jamaica	35
Figura 7 Diagrama de Pareto estandarizado de los factores que presentan influencia en el proceso de extracción.....	37
Figura 8 . A) Gráfico de efectos principales para la concentración de antocianinas; B) Superficie de respuesta estimada para la concentración de antocianinas (mg/100g).....	38

Figura 9 Resultados de la comparación de concentraciones de antocianinas antes y después de microencapsular	41
Figura 10 Espectrofotometría infrarroja FT-IR de las muestras analizadas entre 4000 cm^{-1} a 550 cm^{-1}	43
Figura 11. Diagrama de cajas y bigotes: comparación de la actividad antioxidante in vitro del concentrado y microencapsulado	45

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Determinación de sólidos totales.....	24
Ecuación 2 Determinación de la concentración de antocianinas	25
Ecuación 3 Determinación de la lectura de absorbancia.....	27
Ecuación 4 Determinación del contenido de antocianinas totales	27
Ecuación 5 Rendimiento de la muestra	28
Ecuación 6 Eficiencia de la Microencapsulación.....	29
Ecuación 7 Determinación de la actividad antioxidante	30
Ecuación 8 Porcentaje de inhibición del DPPH.....	31

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Gráfica de determinación de la presencia de antocianinas.....	59
Anexo 2 Valores obtenidos de la extracción y cuantificación de antocianinas de Flor de Jamaica con distintos tratamientos mediante espectrofotometría UV-Vis.	60
Anexo 3 Análisis de Varianza para la determinación de la concentración de antocianinas	61
Anexo 4 Concentración de antocianinas de Flor de Jamaica antes y después de ser encapsuladas.....	61
Anexo 5 Rendimiento del microencapsulado	61
Anexo 6 Obtención del microencapsulado de antocianinas	62

Anexo 7 Determinación del contenido de antocianinas por análisis de pH diferencial...	62
Anexo 8 Análisis de varianza para antocianinas de Flor de Jamaica	62
Anexo 9 Análisis de varianza para determinar el potencial antioxidante in vitro	63
Anexo 10 Curva de calibración entre el % de inhibición vs. μmol equivalentes de Trolox	63

RESUMEN

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles empleadas como colorantes en la preparación de bebidas, vinos e infusiones. Debido a sus propiedades antioxidantes son considerados agentes quimioprotectores y son utilizados en el tratamiento de enfermedades.

El presente trabajo de investigación consistió en la extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de las antocianinas presentes en la *Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica, planta cultivada en el cantón Milagro de la región Cost ecuatoriana. Esta planta es altamente reconocida por sus propiedades medicinales, ya que posee múltiples vitaminas, minerales y compuestos bioactivos importantes para la salud. Para su extracción se utilizó una relación 1:25 material vegetal sobre volumen de disolvente, con temperatura constante de 85 grados centígrados por 30 minutos. La sustancia bioactiva extraída se concentró y microencapsuló mediante la técnica de secado por aspersión, empleando una matriz polimérica (maltodextrina) obteniendo una eficiencia de microencapsulación del 88,02 por ciento. Mediante un análisis de espectroscopía infrarroja se demostró la efectividad de la maltodextrina como polímero al formar microesferas que recubren y protegen a las antocianinas. Para la evaluación de la capacidad antioxidante se realizaron ensayos *in vitro* sobre el extracto concentrado y el microencapsulado, utilizando la técnica de DPPH, obteniendo valores de 328,41 y 219,29 micromol (equivalentes de Trolox sobre gramo de extracto seco) respectivamente.

Palabras claves: antocianinas, flor de Jamaica, plantas medicinales, quimioprotectores, microencapsulación, antioxidantes.

ABSTRACT

Anthocyanins are water-soluble pigments used as colorants in the preparation of beverages, wines, and infusions. Due to their antioxidant properties they are considered as chemoprotective agents and are used in disease treatment.

The present research work consisted of the extraction, microencapsulation and evaluation of the antioxidant capacity of anthocyanins present in *Hibiscus sabdariffa* or Jamaica Flower, a plant cultivated in Milagro city, in the coastal region of Ecuador. This plant is highly recognized for its medicinal properties since it contains multiple vitamins, minerals and bioactive compounds important for health. For its extraction, a ratio of 1:25 plant material to volume of solvent was used, at a constant temperature of 85 plus-minus 5 degrees Celsius for 30 minutes. The extracted bioactive substance was concentrated and microencapsulated by means of the spray drying technique using a polymeric matrix (maltodextrin) where its microencapsulation efficiency was 88.02 percent. Infrared spectroscopy analysis demonstrated the effectiveness of maltodextrin as a polymer, generating microspheres that coated and protected anthocyanins. For the evaluation of antioxidant capacity, *in vitro* tests were carried out on the concentrate extract and the microencapsulated extract, using the DPPH technique, obtaining values of 328,41 and 219,29 micromol (Trolox equivalent per gram of dry extract) respectively.

Key words: anthocyanins, Jamaica flower, medicinal plants, chemoprotectants, microencapsulation, antioxidant.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Descripción de la planta de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

1.1.1.1 Generalidades

La planta de Flor de Jamaica o *Hibiscus sabdariffa*, es un tipo arbusto, perteneciente a la familia de las Malváceas que mide alrededor de 1 a 3 metros de altura con un sistema radicular esparcido y poco profundo, donde presenta un tallo robusto y de color rojizo con hojas trilobadas que suelen llegar a medir unos 15 cm de largo distribuidas de forma alternada en el tallo, sus flores son suculentas, axilares de corola amarilla, blanca o rosada y de base roja, se encuentran formadas de 4 o 5 pétalos (Figura 1)., donde el cáliz, cuando madura, constituye la parte más empleada de esta especie (Ajay et al., 2007).

En el mundo existen más de 150 variedades de esta planta, las cuales se desarrollan en climas tropicales y subtropicales a temperaturas de entre 20 y 28 °C, siendo poca la tolerancia a temperaturas bajas durante largos períodos, además, presenta una importante particularidad al adaptarse a una gran variedad de suelos, ya que es una planta que no requiere de demandantes cuidados, sin embargo (Zapata et al., 2014) menciona que la planta de Flor de Jamaica es más productiva en suelos rojizos y con poca profundidad. Además, se menciona que la temporada de cosecha se realiza cuando la planta da inicio a la etapa de maduración donde su ciclo es de alrededor de seis a siete meses.

Actualmente, el cultivo de la Flor de Jamaica es utilizada en la elaboración de bebidas refrescantes libres de cafeína como el té de Jamaica y en productos alimenticios como colorante natural, además de sus notables propiedades medicinales dentro de las actividades farmacológicas debido a su capacidad antioxidante, sin embargo, ya que el cultivo de la Flor de Jamaica no es altamente difundida ha sido calificada como una alternativa poco rentable en países como Nicaragua, México y el Salvador debido a su baja industrialización (Cuzcano, 2013).

1.1.1.2 Origen

Se han identificado alrededor de 200 especies del género *Hibiscus* L. considerado un grupo heterogéneo debido a su variabilidad morfológica como cromosómica, siendo una planta exigente en cuanto a fotoperiodos de luz (mayor de 11 a 12 horas), cultivada en regiones con climatología favorable como el Sudeste de Asia, Centroamérica y del Sur (Wang & Mazza, 2002).

La Flor de Jamaica -*Hibiscus sabdariffa*-, es reconocida de manera popular como Flor de Jamaica o Rosa de Abisinia (Guatemala y México), Quimbombó (Cuba y Panamá), Roselle (Italia), Mesta (India) y Malven Tee (Alemania) (Alonso, 2004). A continuación

1.1.1.3 Clasificación Taxonómica

Según (Ortiz, 2008), la taxonomía de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 1 Identificación Taxonómica de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

FLOR DE JAMAICA	
Nombre Científico	<i>Hibiscus sabdariffa</i> . L
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Dieniidae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Hibiscus</i>
División	Anthophyta
Especie	<i>H. sabdariffa</i>

Fuente: <https://silo.tips/download/tecnologia-resumen-palabras-clave-hibiscus-sabdariffa-l-macronutrientes-minerale> ; (Ortiz, 2008)



Figura 1 Planta de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

Nota: Adaptado de *Seednative* [Fotografía], por Empresa SEEDNATIVE Semillas y Plantas.

Fuente: (Badreldin, Wabel, & Blunden, 2005)

1.1.1.4 Distribución Geográfica

La Flor de Jamaica ha sido intensamente cultivada desde Egipto, Sudán y Senegal debido a sus propiedades medicinales, además de ser cultivada en Centro América, El Caribe y el Sudeste Asiático. Según (**Sumaya Martínez et al., 2014**) en su estudio de Potencial de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en la elaboración de alimentos funcionales con actividad antioxidante, se han desarrollado nuevas estrategias que han permitido cultivar la Planta de Flor de Jamaica en países en Centroamérica y Sudamérica.

El Ecuador está ubicado en un área adecuada para su adaptación y sembrío debido a la variedad de regiones tropicales y subtropicales que posee, no obstante, al tener una baja difusión en nuestro medio solamente se muestran pequeñas zonas de cultivo en la región Amazónica y Costa, encontrándolos en áreas pertenecientes a las provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago en la zona de Sucúa y en la región Costa se los encuentra en los cantones Isidro Ayora, Milagro y Pasaje. (**Salinas et al., 2003**)

Por tanto, aunque en el Ecuador existe una escasa difusión, el cultivo de *Hibiscus sabdariffa* ha sido acogido por ciertos agricultores que conocen sus propiedades y la

demanda existente en el mercado. No obstante, debido a que es un producto poco elaborado y sin suficientes investigaciones que lo avalen, constituye un ligero inconveniente en el sector dedicado a su cultivo (**Sumaya Martínez et al., 2014**).

1.1.1.5 Descripción Botánica

H. sabdariffa es una planta tipo arbusto, propia de climas subtropicales, herbácea, semileñosa y de fotoperiodicidad marcada que puede alcanzar de 1 a 2 metros de altura con raíz de tipo pivotante (**Hidalgo V. et al., 2009**). La planta presenta un tallo de forma cilíndrica, ramificada y de color rojizo, que produce una fibra empleada para sustituir al yute en la fabricación de cordeles, además posee hojas ubicadas de manera alterna ovadas y trilobadas que miden de 7,5 a 12 cm de longitud con nervaduras rojas y bordes de forma irregular (**Sindi et al., 2014**). Sus flores son solitarias y axilares, unidas en la base a un cáliz carnosos rojo-pardo y de forma de corola acampanada, provista de pétalos que, al marchitarse y desaparecer la corola, quedan de 5 a 6 sépalos con forma de copa, que se alargan y tienden a ponerse carnosos de un color rojo intenso brillante (**Babalola et al., 2001**)

El sistema radicular es herbáceo y poco profundo, donde aumenta su profundidad hasta 1,5 metros en suelos arenosos. La cápsula o fruto es seco y vellosos, puesto que posee 5 compartimentos, envuelto por el cáliz carnosos, donde presenta una forma ovoide que contiene semillas reniformes (4 a 20 semillas) de color café oscuro, de 3 a 5 mm de largo y un peso aproximado de 2 g (**Martínez et al., 2000**).

1.1.1.6 Composición química y valor nutricional

La composición química de la *Hibiscus sabdariffa*, parte desde los componentes presentes en los cálices destacando la presencia desde el punto de vista farmacológico a los ácidos orgánicos (málico, cítrico, tartárico, hibísico), antocianinas (delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, delfinidina-3-sambubiósido, cianidina-3-sambubiósido), flavonoides, polisacáridos, compuestos fenólicos, proteínas, β -caroteno, vitamina A, vitamina B₁, vitamina B₂ y vitamina B₁₂ (**Galicia et al., 2008**).

Según, (Fernández-Arroyo et al., 2011) en su estudio de Cuantificación de polifenoles a partir de extractos acuosos de *H. sabdariffa*, se han identificado ciertos tipos de ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, ácido protocatéquico y galocatequina en extractos a partir de cálices de *H. sabdariffa*. Dentro de sus variados componentes químicos también se detalla su tonalidad, siendo una de sus peculiaridades más importantes en la calidad organoléptica de los alimentos, teniendo una gran influencia sobre su valor estético, además de emplearse como base para la admisión de una extensa variedad de productos en el ámbito alimenticio (Stringheta, 1991).

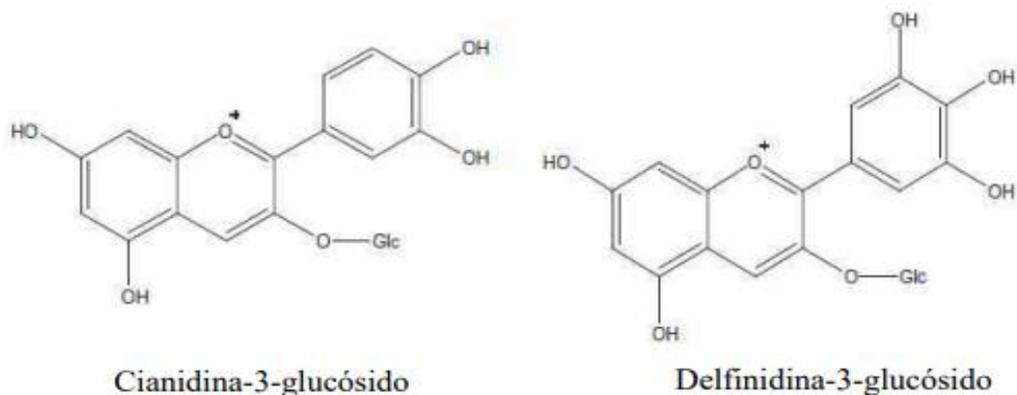


Figura 2 Antocianos presentes en la Flor de Jamaica

Fuente: (Lee et al., 2002)

Los valores de proteína y demás componentes suelen llegar a ser muy variables dependiendo la especie analizada, se tiene en cuenta que la Flor de Jamaica presenta una gran fuente de hierro, potasio, calcio y magnesio, además en el estudio de (Navas et al, 2012) sobre análisis y actividad antioxidante de compuestos antociánicos se ha demostrado la presencia de otros polifenoles como la gosipetina, quercetina, luteolina y derivados de glucósidos. Todos estos compuestos bioactivos se caracterizan por presentar actividad antioxidante (Wong et al., 2002). Por otra parte, los cálices son ricos en fibra dietética, minerales y vitaminas como la tiamina, niacina y riboflavina, observando un efecto hipotensor y su participación en la reducción de las concentraciones de creatinina en la orina. (Mojiminiyi et al., 2000). Además, los extractos etanólicos de los cálices secos reducen los niveles de malondialdehído, demostrando claramente su capacidad antioxidante y actuando como un citoprotector (Usoh et al., 2005).

Tabla 2 Composición proximal de cálices de Jamaica (g/100 g de materia seca)

COMPONENTE	Roselle africana	Roselle USA	Roselle mexicana
Proteína	8,6	17,4	9,87
Lípidos	2,0	2,61	0,59
Cenizas	6,8	6,9	9,75
Fibra cruda	8,5	12,0	–
Fibra dietética total	–	–	33,90
- Fibra insoluble	–	–	29,04
- Fibra soluble	–	–	4,87
Minerales y Vitaminas (mg/100g)			
Calcio	1263	1602	–
Potasio	2320	2732	–
Fósforo	163,1	–	–
Hierro	34,6	8,98	37,80
Magnesio	340	309	316
Zinc	6,3	–	–
Vitaminas			
Ácido ascórbico	54,8	67	–
Niacina	–	3,76	–
Tiamina	–	0,117	–
Riboflavina	–	0,277	–

Fuente: (AOAC, 2000)

La composición proximal de los cálices de Jamaica a través del método AOAC destacan que el componente de mayor proporción es la fibra dietética, con propiedades funcionales que le confieren un aumento en su valor agregado, además que la cantidad de componentes no digeribles presentes es significativamente alto, llevando a plantear estrategias comerciales debido a la cantidad de componentes bioactivos que no son utilizados en su totalidad (Csernoch et al., 2018).

Los distintos componentes que presenta la *Hibiscus sabdariffa* L. según (Mahadevan et al., 2009) se mencionan de manera detallada en la siguiente tabla.

Tabla 3 Componentes químicos de la *Hibiscus sabdariffa* L.

Parte de la planta	Componentes químicos
Semilla	Proteína, grasa y fibra dietética, fósforo, magnesio, calcio, almidón, celulosa, hidratos de carbono, ergosterol, ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico, metanol, ácido malvalico, ácido linoleico, alcohol isoamílico, etanol, 3-metil-1-butanol.
Flor	Manosa, sacarosa, tiamina, xilosa, hidratos de carbono, la niacina, la pectina, proteínas, grasas, arabinanos, arabinogalactanos, rhamnogalacturans, riboflavina, β -caroteno, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-sambubiósido, delphinidina-3-glucósido, delphinidina-3-sambubiosido.
Hoja	Proteínas, hidratos de carbono, hierro, calcio, fósforo, tiamina, α -acetato de terpinilo, anisaldehído, β -caroteno, β -sitosterol, alcohol isoamílico, alcohol isopropílico, metanol, 3-metil-1-butanol, etanol, ácido málico, fibra y cenizas.
Cáliz	Hierro, fósforo, calcio, magnesio, potasio, pectina, citrato, ácido ascórbico, quercetina, luteolina y gosipetina.
Frutos	α -acetato de terpinilo, pectina, anisaldehído, ácido acético, etanol, ácido fórmico, ácido caprílico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido ascórbico, oxalato de calcio, 3-metil-1-butanol, benzaldehído, metanol y minerales.

Fuente: (Mahadevan, Shivali, & Pradeep, 2009).

Tabla 4 Contenido en compuestos polifenólicos de los cálices de la flor de Jamaica (g/100 g de materia seca)

Polifenoles extraíbles	2,17 ± 0,04
- Ácidos Hidroxibenzoicos	32,60
- Antocianidinas	30,80
- Flavonoles	5,87
Polifenoles no extraíbles	
- Proantocianidinas (taninos condensados)	3,38 ± 0,06
- Polifenoles hidrolizables	0,58 ± 0,03

Fuente: (Sáyago, Arranz, Serrano, & Goñi, 2007)

La presencia de compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) señalan una gran importancia nutricional ya que ejercen su principal actividad biológica relacionada con su capacidad antioxidante, antimicrobiana y secuestro de radicales libres (**Dolara et al., 2005**).

Tabla 5 Capacidad antioxidante de los cálices de la Flor de Jamaica y algunos subproductos vegetales

Capacidad Antioxidante (método de medición)			
MATERIAL	ABTS	FRAP	DPPH (EC50)
	($\mu\text{mol trolox equivalents/g materia seca}$)		(g materia seca/g DPPH)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	90,8	66,3	
Orujo de uva blanca	124,4 ± 0,3	–	
Orujo de uva roja	–	525 ± 28	1,53
Cáscara de mango	–	–	1,92

Fuente: (Sáyago, Arranz, Serrano, & Goñi, 2007)

Las características funcionales de la *Hibiscus* derivadas del contenido en fibra saludable, así como la capacidad antioxidante justifican su uso como ingrediente en alimentos, productos farmacéuticos y en bebidas hidratantes, teniendo un agregado nutricional para la salud debido a su alto contenido de vitaminas y minerales, **(Bazzano et al., 2002)** en su estudio, sobre tratamientos de enfermedades cardiovasculares empleando la ingesta de verduras y fruta, han demostrado la contribución de la fibra dietética en el mantenimiento de la salud gastrointestinal, en la disminución de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer.

1.1.2 Antocianinas

1.1.2.1 Generalidades

Son pigmentos hidrosolubles de amplia distribución en la naturaleza, responsables bajo diferentes factores intrínsecos, de una alta gama de tonalidades rojas, naranjas, azules y moradas de muchas flores, frutas y verduras. Se encuentran localizadas en las vacuolas de las células vegetales, donde poseen una mayor concentración en flores, frutas, tallos y cálices **(Navas et al., 2012)**.

Forman parte de la familia de los flavonoides, donde en la actualidad se conocen más de 100 tipos diferentes responsables de las distintas variedades de colores en flores, frutos entre otros. Las antocianinas al ser pigmentos solubles en agua se encuentran presentes en sistemas acuosos alimentarios participando de manera activa como agentes potenciales con valor agregado en la dieta diaria humana **(Kong et al., 2003)** formando parte en la ecofisiología, propagación de las plantas, ayudando a atraer polinizadores que actúan directamente en los mecanismos de defensa contra factores de estrés ambientales y bióticos **(Menzies et al., 2016)**, además de actuar como colorante natural en la industria alimentaria y como agente con capacidad antioxidante en la industria farmacéutica.

1.1.2.2 Estructura Química

Se encuentran compuestas de una estructura básica ordenada en dos anillos bencénicos, unidos mediante un anillo pirano formando una molécula de antocianidina denominada aglicona (catión 2-fenilbenzopirilio o flavilio), a la que se le une una molécula de azúcar mediante un enlace glucosídico **(Ozela et al., 2007)**, el carácter polar que posee la

molécula de antocianina le permite obtener una alta solubilidad al contacto con distintos solventes tales como alcohol y agua, produciendo que la aglicona o genina debido a sus enlaces conjugados se encargue de donar electrones y así se alcance a observar los diversos colores característicos de las antocianinas ya que el incremento en la hidroxilación produce un desplazamiento hacia la tonalidad azul y el incremento de las metoxilaciones ocasiona una tonalidad roja (Cadena et al., 2008).

En la siguiente tabla, propuesta por (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001) se presentan los sustituyentes y espectros de longitud de onda de las antocianinas.

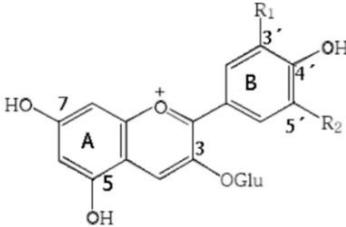
Antocianidina	Estructura básica	Sustitución		Espectro visible λ (nm)	Color
		R ₁	R ₂		
Peonidina		OCH ₃	H	505	Naranja
Pelargonidina		H	H	510	Naranja-rojo
Delfinidina		OH	OH	522	Azul-rojo
Cianidina		OH	H	520	Azul-rojo
Petunidina		OCH ₃	OH	532	Naranja-rojo
Malvidina		OCH ₃	OCH ₃	546	Azul-rojo

Figura 3 Estructura química y sustituyentes de las antocianinas

Fuente: (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001)

La presencia de los sustituyentes químicos en los anillos A y B de las antocianinas, según (Wang & Mazza, 2002) determina la naturaleza de los otros compuestos con diversos colores, señalando que entre más veces se encuentre sustituida la molécula ésta obtendrá un color menos claro, por tanto, las características cromáticas que se presentan en las diferentes partes de la planta son afectadas directamente por los sustituyentes químicos que puede llegar a poseer la molécula, tomando en cuenta la orientación y posición que conlleven en el grupo flavilio, donde un aumento del grado de hidroxilación genera un desplazamiento batocrómico es decir que la absorbancia de la luz se desplaza de un tono

rojo a uno púrpura, ocasionando un aumento en la longitud de onda del espectro visible (Garzón, 2008).

1.1.2.3 Factores que determinan la estabilidad de las antocianinas

Existen ciertos factores que contribuyen en la estabilidad de las antocianinas, como lo es el pH, la temperatura, la luz, el oxígeno, las enzimas, la formación de complejos y la copigmentación que influye directamente en la tonalidad debido a la interacción entre las antocianinas y sustancias orgánicas (Csernoch et al., 2018).

1.1.2.3.1 Efecto del pH

El pH afecta directamente en la estabilidad y la estructura de la molécula; puesto que la acidez posee un efecto protector en soluciones acuosas a pH bajo. Las antocianinas son más estables en medio ácido, puesto que la forma que predomina es la del ión flavilio, que posee una tonalidad roja, al ser sometidas a soluciones con pH neutro o alcalino, el ión se vuelve frágil al ataque nucleofílico, lo que genera una pseudobase denominada carbinol, que ocurre a pH 4,5 formando estructuras de acetonas aromáticas o chalconas, que poseen formas incoloras (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001)

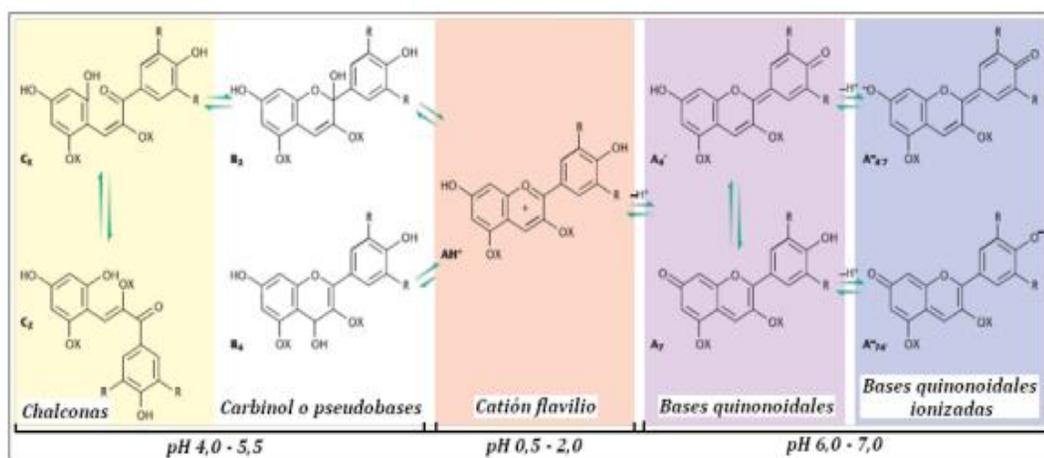


Figura 4 Tonalidad de las antocianinas a distintos niveles de pH

Fuente: (Andersen & Jordheim, 2006)

1.1.2.3.2 Efecto de la temperatura

La temperatura actúa directamente en la estabilidad de las antocianinas debido a que su incremento produce una disminución en su coloración, reduciendo su estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento, ya que la combinación de operaciones involucra un aumento de temperatura que afecta el contenido de las antocianinas, generando eventualmente productos cafés, fundamentalmente por la presencia de oxígeno (**Cavalcanti et al., 2011**). La pérdida del azúcar glicosilante, produce una disminución en la coloración de los compuestos antociánicos por efecto directo de la temperatura, ya que a medida que aumenta se produce la apertura del anillo en la posición 3' de la molécula antociánica provocando que los enlaces glicosídicos lleguen a hidrolizar, produciendo así chalconas incoloras (**Garzón, 2008**).

1.1.2.3.3 Efecto de la luz

La luz al actuar sobre las antocianinas se maneja de cierta forma en la naturaleza, siendo esencial para la biosíntesis en las flores, pero acelerando los procesos de degradación durante el almacenamiento, por tal razón, las antocianinas conservan su color cuando se almacenan en oscuridad (**Ajay et al., 2007**).

Además, (**Cavalcanti et al., 2011**) señalan que se ha estudiado la estabilidad que presentan las antocianinas bajo la luz de neón y en oscuridad por 24 semanas con resultados contundentes al mostrar que el efecto de la luz decrece de manera considerable el contenido de fenoles y de las antocianinas durante el almacenamiento.

1.1.2.3.4 Efecto del oxígeno

Participa junto con la temperatura en otros procesos de degradación ya que conjuntamente pueden deteriorar el color de las antocianinas aisladas mediante un mecanismo oxidativo generando un efecto desestabilizante (**Garzón, 2008**).

Según, (**Bermúdez et al., 2016**), el oxígeno y la temperatura son considerados como agentes que aceleran la degradación de las antocianinas generando productos pardos e incoloros, como resultado de la oxidación de la base carbinol.

La presencia de polifenol-oxidasas, glucosidasas y ciertas enzimas endógenas en muchos tejidos de plantas han mostrado una directa implicación en la decoloración oxidativa de las antocianinas (**Shiraishi et al., 2007**).

1.1.2.3.5 Efecto de las enzimas

La capacidad de separar los enlaces o-glicosídicos, genera de manera indirecta compuestos inestables, responsables de polimerizar y formar pigmentos pardos, produciendo de esta manera efectos significativos sobre las características cromáticas de las antocianinas (**Figuroa et al., 2010**).

1.1.2.4 Propiedades funcionales de las antocianinas

Las propiedades farmacológicas y terapéuticas que han llegado a presentar ciertos pigmentos antociánicos se han vuelto una alternativa significativa en la reducción de efectos anticancerígenos, antitumorales y antidiabéticos todo gracias a su acción antioxidante, donde bajo estudios (**Ghiselliet al., 1998**) se han señalado que fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado ser precisas en atrapar especies reactivas del oxígeno, inhibiendo la oxidación de lipoproteínas y en su participación activa en procesos dentro de la agregación de plaquetas.

Las antocianinas son pigmentos que en la actualidad han demostrado un gran potencial en el ámbito alimenticio, actuando como un reemplazo competitivo de colorantes sintéticos ofreciendo una alta gama de colores que comprende desde el rojo hasta el azul de ciertas frutas y vegetales, además de estar asociado al ámbito cosmético y farmacéutico debido a su amplio esquema de propiedades químicas y bioactivas (**Stintzing et al., 2002**).

A las antocianinas también se les atribuye el mejoramiento de la agudeza visual y el comportamiento cognitivo, debido a su variedad de bioactividades que maneja, como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, cardioprotector entre otros, haciendo más grande su potencial según (**Hale et al., 2005**) en su investigación sobre la suplementación con polifenoles que mejoran el déficit relacionado con la edad, explican que este tipo de pigmentos se encuentran estrechamente ligados en la prevención de enfermedades que implican propiedades activas sobre la salud humana.

1.1.2.5 Importancia de las antocianinas

La inclinación por las antocianinas se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades medicinales, donde estudios realizados por **(Wen et al., 2015)** en su análisis de la Optimización del proceso de extracción de antocianinas, han demostrado los efectos que ejercen los pigmentos antociánicos, atribuyendo la reducción de enfermedades coronarias, afecciones respiratorias, bajas defensas, estreñimiento, efectos antiinflamatorios, antitumorales y antidiabéticos.

Adicionalmente, estudios científicos **(González-Stuart, 2010)** sobre las múltiples propiedades de la *H. sabdariffa*, han concluido que aunque no se debe dejar de prestar atención a las propiedades nutricionales de esta planta, los efectos más representativos se deben a la capacidad antioxidante de sus compuestos constitutivos, por tanto, sus hojas, cálices y semillas son considerados alimentos funcionales con propiedad antioxidante.

En la actualidad, las antocianinas presentan diversos beneficios enfocados a la salud humana, la industria alimentaria y cosmética, además ciertos son los estudios **(Vareed et al., 2006)** que mencionan los efectos antiinflamatorios de las antocianinas, es especial las de tipo delphinidina o delphinidol, las cuáles participan de manera activa en la inhibición de ciertas enzimas lisiloxidasas y ciclooxigenasas, además de tener un efecto significativo sobre algunas enfermedades de tipo coronario que están estrechamente asociadas en la inhibición de la peroxidación lipídica. Siendo necesario la aplicación de más estudios para establecer el alcance de sus propiedades promotoras.

1.1.2.6 Extracción de antocianinas

Para la extracción de antocianinas, se han desarrollado una cantidad de métodos según **(Zapata et al., 2014)** que intentan obtener el mejor rendimiento del compuesto analizando distintas condiciones que permitan alcanzar los mayores beneficios potenciales, donde **(Riera A. , 2020)** menciona que debido a la fuerte actividad antioxidante que presenta las antocianinas aumentan su uso tanto en la industria farmacéutica como alimentaria.

Existen ciertos métodos aplicados para la extracción de antocianinas, donde **(Wang & Mazza, 2002)** en su estudio sobre efectos inhibidores de las antocianinas, han propuesto

diferentes técnicas de extracción donde las antocianinas al poseer un carácter polar permite su solubilidad en disolventes tales como metanol, etanol, acetona y agua.

Los métodos de extracción de antocianinas varían dependiendo el objeto de aplicación, ya que son influenciadas directamente por factores como la concentración de antocianinas extraídas, su estabilidad en el tiempo, la temperatura de exposición, el tiempo de extracción, entre otros (**Bridgers et al., 2010**). Actualmente se han desarrollado alternativas, como la extracción asistida por radiación con microondas (EAM) y el método de extracción-fermentación simultánea empleando levaduras (EFS), demostrando una extracción con mayor eficiencia, selectividad, bajo empleo de disolventes o ausencia de ellos y alcanzando un alto nivel de automatización (**Wen et al., 2015**)

1.1.3 Microencapsulación

La encapsulación es un proceso que según (**Nesterenko et al., 2013**) generalmente radica en proteger un determinado compuesto bioactivo contra el medio ambiente circundante y frente a factores como la humedad, el pH y la oxidación que pueden llegar a alterar la sustancia de interés, teniendo como objetivo conseguir productos con tamaño micrométrico. En el caso de las antocianinas ayudando a mantener su estabilidad y viabilidad con el fin de potenciar su capacidad antioxidante y el control de la liberación del componente activo logrando mejorar el sabor, aroma y valor nutritivo del producto de interés (**Csernoch, Gallo, & Mazzobre, 2018**).

La liberación del contenido de la micropartícula es manejada a velocidades controladas llegando a ser desencadenada por factores como el calor, solubilización, cizallamiento, acción enzimática entre otros y debido a su rápida percibibilidad las aplicaciones técnicas se han incrementado para ofrecer una alta capacidad de protección y conservación, logrando mejores condiciones para que los compuestos presenten una mayor estabilidad alargando su vida útil (**Garzón, 2008**).

1.1.3.1 Técnicas de microencapsulación

Para la selección de una técnica de microencapsulación es primordial tener en cuenta ciertos aspectos tales como el tamaño, la biocompatibilidad y la biodegradabilidad de las micropartículas, las propiedades fisicoquímicas del material núcleo y pared, el mecanismo

para liberar el núcleo activo, la aplicación de la partícula y el costo del proceso para controlar la liberación del componente activo (Ersus & Yurdagel, 2007), por tanto, en la Tabla 6. se presentan procesos que se pueden emplear para la obtención de ingredientes encapsulados.

Tabla 6 Procesos para la obtención de componentes microencapsulados

PROCESOS	
	Secado por aspersión
	Spray cooling/chilling
	Lecho fluidizado
	Separación de fase (coacervación)
	Gelación
	Expansión de fluido supercrítico
	Polimerización artificial
	Polimerización en emulsión
	Atrapamiento de liposoma

Fuente: (Nesterenko, Alric, Silvestre, & Durrieu, 2013)

Al día de hoy, se han desarrollado varias técnicas para microencapsular, sin embargo, el método de secado por aspersión es el más utilizado debido a su disponibilidad en equipos y producción de bajo costo (Gharsallaoui et al., 2007), siendo 30 veces más económico comparado con otros métodos. Además, esta técnica asegura la estabilidad de los productos, evitando el riesgo de degradaciones químicas, como la reducción en el costo de almacenamiento, manteniendo las propiedades fisicoquímicas y obteniendo un producto con solubilidad instantánea (Ersus & Yurdagel, 2007).

De esta manera, el secado por aspersión según (Rigon & Zapata, 2016) es una técnica sencilla basada en la atomización de un producto líquido hasta formar una nube de

minúsculas gotas que se ponen en contacto con una corriente de gas caliente con el fin de producir un polvo de manera instantánea. El propósito de esta técnica radica en generar la creación de una máxima transferencia de calor entre el aire seco y el líquido, generalmente se emplea un gas inerte como el nitrógeno (Souza et al., 2018). El proceso seguidamente, toma lugar por una etapa de contacto gota-aire caliente dando inicio al secado del líquido, para alcanzar la etapa de evaporación de agua de manera instantánea y la separación del producto seco y el aire húmedo (Esquivel-González & Quiñones, 2015).

1.1.4 Importancia de la microencapsulación

La implicación que toman las técnicas de microencapsulación, se ha incrementado sobre todo en el área de los alimentos, donde (Gordillo et al., 2012) mencionan que la protección de las sustancias encapsuladas frente a distintos factores es primordial para mantener una alta estabilidad y viabilidad de los encapsulados.

De esta manera cabe mencionar que las antocianinas presentan baja estabilidad, debido a su alta sensibilidad a cambios de pH, temperatura, luz y otros factores, que la convierten en una limitante para este tipo de pigmentos, que poseen una alta actividad antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria, antibacteriana y con efecto citotóxico selectivo (Badreldin et al., 2005).

Así, en el ámbito alimentario, farmacéutico y biotecnológico la microencapsulación presenta una gran importancia ya que se aplica en la estabilización y protección del material activo frente a la degradación, oxidación, fotosensibilidad o a la reacción con otros compuestos, con el fin de mejorar su estabilidad, dosificación, control de liberación de sustancias y mejorando la biodisponibilidad de nutrientes (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001).

1.1.5 Actividad antioxidante

En la actualidad, los seres humanos nos encontramos expuestos de manera directa a un extenso número de agentes oxidantes, provenientes de la contaminación ambiental, compuestos químicos en alimentos o productos de las reacciones bioquímicas generadas en el organismo, resultando en la formación de radicales libres, responsables del daño

oxidativo y efectos negativos en el metabolismo celular (Venereo, 2002), donde los compuestos capaces de inhibir dichos radicales se denominan agentes antioxidantes.

En consecuencia, la actividad antioxidante en *Hibiscus sabdariffa* es una de las actividades biológicas más estudiadas, puesto que se le atribuye un alto perfil de propiedades que aseguran su capacidad de capturar especies reactivas de oxígeno mediante un proceso de donación de electrones (Castañeda et al., 2008).

1.2 HIPOTESIS

1.2.1 Hipótesis Nula

H_0 : Las antocianinas microencapsuladas de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) no presentan actividad antioxidante.

1.2.2 Hipótesis Alternativa

H_1 : Las antocianinas microencapsuladas de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) presentan actividad antioxidante.

1.3 Señalización de Variables de la hipótesis

1.3.1 Variables dependientes

Capacidad antioxidante del microencapsulado

1.3.2 Variables independientes

Relación material vegetal / volumen del disolvente y tiempo de extracción.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Extraer las antocianinas presentes en las flores de *Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica para su microencapsulación y evaluar posteriormente su capacidad antioxidante.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Analizar la influencia del tiempo y la temperatura durante el proceso de extracción sólido-líquido de las antocianinas presentes en las flores de *Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica.
- Identificar el punto óptimo para alcanzar el mayor rendimiento y eficiencia de microencapsulación de las antocianinas presentes en las flores de *Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica.
- Evaluar la concentración de antocianinas presentes en las flores de *Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica mediante el análisis de espectrofotometría en el proceso de extracción.
- Determinar la capacidad antioxidante de las antocianinas de las flores de *Hibiscus sabdariffa* sin microencapsular y posteriormente microencapsuladas.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Materia Prima

Las muestras a evaluar (*Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica), fueron adquiridas por donación de la empresa PROINBE, ubicada en la Provincia de Tungurahua, Cantón Ambato sector Av. Manuelita Sáenz.

2.1.2 Materiales de Laboratorio

El desarrollo experimental se realizó en los laboratorios de Investigación de la Unidad Operativa (UODIDE-FCIAB), Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. A continuación, se presentan los materiales utilizados en la presente investigación:

Tabla 7. Materiales proceso experimental

MATERIAL	CANTIDAD
Micropipetas regulables	3 (10 a 100, 20 a 200 y 100 a 1000 µl)
Celdas para espectrofotometría	4 (ThermoElectron 10 mm)
Microplaca	2 (de 96 pocillos)
Tubos Eppendorf	8 (1,5 ml)
Termómetro metálico	1 (rango 0 a 120 °C)
Reactor de acero inoxidable	1 (4 Litros)
Agitadores magnéticos	4
Pera de succión	1
Papel Aluminio	1
Espátula	1
Papel absorbente	1
Guantes de nitrilo	2

Tabla 8 Materiales de vidrio empleados para el proceso experimental

MATERIAL	CANTIDAD
Matraz Erlenmeyer	2 (500 ml)
Vaso de precipitación	4 (250 ml)
Matraz aforado	2 (25 ml)
Frasco de cristal ámbar	1 (250 ml)
Probetas graduadas	3 (25, 50 y 100 ml)
Pipeta graduada	1 (10 ml)
Varilla de agitación	1

2.1.3 Equipos

Durante el proceso experimental se utilizaron los siguientes equipos descritos a continuación:

Tabla 9 Equipos empleados para el proceso experimental

PROCESO	EQUIPO
Pesaje de muestras	Balanza Analítica (OHAUS, modelo Adventurer Pro)
Extracción de antocianinas	Plancha de calentamiento (CORNING PC-420D)
Determinación de los grados Brix ^o	Refractómetro (Atago, ABBE)
Determinación de sólidos totales	Balanza de Humedad (KERN MLS 50-3)
Medición de Ph	pH-Metro (ORION 420 ^a)
Escala mayor del extracto de antocianinas	Reactor
Extracción del concentrado	Rotaevaporador (IKA-HB10)
Preparación de soluciones Buffer	Campana de extracción
Microencapsulación	Mini Spray Dryer (BUCHI-B290)
Determinación de la concentración de antocianinas	Espectrofotómetro UV-VIS (Fisherbrand™ accuSkan™ GO)

Determinación de grupos funcionales de las antocianinas (microencapsuladas)	Espectrofotómetro infrarrojo FT-IR (Perkinelmer)
Evaluación de la capacidad antioxidante	Espectrofotómetro UV-VIS (Fisherbrand™ accuSkan™ GO)
Análisis Estadístico	Computadora HP (Software de análisis de datos estadísticos y gráficos, Statgraphics XVII 64x)

Fuente: (Riera A. , 2020)

Nota: La mayoría de los equipos fueron utilizados bajo la supervisión del tutor o responsable de laboratorio

2.1.4 Reactivos

- Etanol al 96 % de pureza
- Buffer de Cloruro de Potasio 0,025 mol/l-PH 1
- Buffer de Acetato de Sodio 0,4 mol/l-PH 4,5
- Ácido clorhídrico al 37 %
- Maltodextrina Roig Pharma
- Metanol al 96 % de pureza
- Trolox 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acido 97 %
- Reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

2.2 Métodos

2.2.1 Trabajo de campo

2.2.1.1 Recolección de la materia prima (flores)

Para el desarrollo de la investigación se utilizó las flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), provenientes del Cantón Milagro provincia del Guayas, obtenidas de la empresa PROINBE, ubicada en la ciudad de Ambato, siendo posteriormente trasladadas cuidadosamente a los laboratorios de la UODIDE-FCIAB, en los planteles de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato, donde fue necesario considerar el estado de las flores en función a factores específicos como las condiciones ambientales de almacenamiento, estado de desarrollo de la flor, presencia de daño físico y libres de deterioro generado por insectos ya que tienden

a influir de manera directa en la composición química y la calidad del material vegetal (Sharapin, 2000).

Seguidamente la materia prima fue almacenada en fundas herméticas y llevadas a refrigeración, evitando la desecación y teniendo cuidado para no ocasionar desgastes físicos y bacteriológicos en el estudio.

2.2.2 Trabajo de Laboratorio

2.2.2.1 Preparación del material vegetal

El proceso de preparación de las flores de Jamaica, inició a partir de un lavado con agua potable para retirar cualquier tipo de residuo que evite tener un material investigativo de buena calidad, consecuentemente se procedió a dejarlas en refrigeración para evitar que se resequen al ambiente, tomando en cuenta que para la extracción de antocianinas es necesario los cálices, tallos y las flores de la Jamaica. En el caso de algún tipo de inflorescencia se retiró cuidadosamente cortando cada una de ellas, por otra parte, los cálices maduros que presentaron un tono vinoso fueron colocados en un procesador denominado Thermomix o Incubadora de Laboratorio, procurando un correcto secado progresivo puesto que presentan diversos usos en el ámbito alimentario. El material vegetal sobrante tomó lugar en el área de refrigeración para emplearlo en el presente proyecto investigativo.

2.2.2.2 Obtención del extracto de antocianinas

Una vez que el material vegetal se encuentra preparado se inició la extracción de las antocianinas en soluciones con disolvente agua y disolvente etanol 96 % con ácido clorhídrico al 37 % en relación 85:15; donde las muestras se tomaron en proporciones de 1/20 y 1/25 considerando la relación sólido-líquido, a un tiempo de 15 y 30 minutos y a una temperatura aproximada de 85 °C. Para la preparación de las muestras en estudio se analizó la proporción 1/20 en donde se pesó 7,5 g de la muestra y para la relación 1/25 se pesó 6 g, respectivamente, de flor de Jamaica en una balanza analítica “Ohaus”, donde fueron colocados dentro de vasos de precipitación con el disolvente a 150 ml.

A continuación, se realizó la extracción de las muestras con disolvente agua y con disolvente etanol 96 % con ácido clorhídrico 37 %, sobre una plancha de calentamiento

“Corning PC-420D” donde fueron removidas empleando agitadores magnéticos durante 15 y 30 minutos, a una temperatura de 85 °C y 200 r/min hasta ebullición, obteniendo resultados significativamente relevantes para la investigación, ya que la evaluación del contenido de antocianinas totales reveló que el agua es el disolvente más eficiente en el proceso de extracción, por lo cual, se procedió a continuar el estudio a partir de las extracciones con disolvente agua. En la preparación del disolvente se debería haber empleado metanol, ya que es un solvente más efectivo, sin embargo, debido a su alta toxicidad se llegó a considerar ser sustituido por agua en relación de las proporciones mencionadas anteriormente.

Una vez terminado el ciclo se dejó en reposo para que alcancen la temperatura ambiente siendo posteriormente almacenadas en matraces Erlenmeyer totalmente envueltos en papel aluminio con el fin de evitar alguna alteración de las antocianinas en la solución.

2.2.2.3 Determinación de los grados Brix

Los grados Brix de los extractos obtenidos de *Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica se determinaron con el empleo de un Refractómetro de 0-90°brix ATC con la finalidad de medir los sólidos solubles presentes en las muestras a temperatura ambiente, donde inicialmente se partió calibrando el refractómetro con agua destilada y seguidamente se tomó unas cuantas gotas del extracto colocándolas en el prisma para observar los resultados.

2.2.2.4 Determinación de sólidos totales

Los sólidos totales de la flor de Jamaica, se determinaron aplicando la utilización de una termobalanza de humedad (KERN MLS 50-3) permitiendo medir la humedad residual de cada una de las muestras por triplicado para un mejor análisis, donde se empleó un volumen de 5 ml, obteniendo de esta manera los sólidos totales extraídos.

Según (Riera A. , 2020) la fórmula que aplicó en su estudio ha sido empleada en la presente investigación para la determinación de los sólidos totales.

$$\% SST = 100 - \% \text{ humedad (muestras)}$$

Ecuación 1. Determinación de sólidos totales

2.2.2.5 Determinación de la concentración de antocianinas

Para la determinación de la concentración de antocianinas se empleó el método analítico por espectrofotometría y el método químico por pH diferencial, con el propósito de desarrollar una validación a través de una técnica sencilla y una más precisa, que incluso permite detectar la presencia de pigmentos degradados y otros compuestos de interferencia.

2.2.2.5.1 Análisis por espectrofotometría

Para determinar la concentración de antocianinas se midió la absorbancia de cada uno de los extractos por triplicado, utilizando un espectrofotómetro (UV-Vis ThermoScientific) donde se planteó un factor de dilución 1:50 para el análisis con disolvente agua en las muestras 1/20 y 1/25 a 30 minutos, considerando que el blanco para las muestras para las muestras es agua. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 520 nm, donde se alcanzó a observar la variación de la absorbancia en cada una de las muestras, según (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001) el rango de las antocianinas presentes en la *Hibiscus sabdariffa* se encuentra entre 520 y 522 nm, permitiendo determinar la concentración de antocianinas en el extracto con mayor certidumbre.

A continuación, se empleó la siguiente fórmula propuesta por (Abdel-Aal & Hucl, 1999) para la determinación de la concentración de antocianinas (mg/100g), la misma que fue utilizada por (Moreno, 2020) en su estudio de extracción de antocianinas de fréjol rojo.

$$C = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{vol}{1000} \times MW \times \frac{1}{sample\ wt} \times 10^6 \times FD$$

Ecuación 2. Determinación de la concentración de antocianinas

Donde:

C: Es la concentración de antocianinas mg/100 g

A: Es la absorbancia

ε : Es la absortividad molar (Cianidina 3-glucósido $26900\text{ l cm}^{-1}\text{moll}^{-1}$)

FD: Factor de dilución (1:25)

Vol: Volumen total del extracto de antocianinas

MW: Peso molecular (Cianidina 3-glucósido 449,6 g/l

2.2.2.5.2 Análisis por pH diferencial

Dado que el pH es uno de los principales factores que afecta la estabilidad de las antocianinas, los espectros de UV-VIS a distintos valores de pH tienden a variar, permitiendo determinar si las antocianinas presentes se encuentran o no polimerizadas (**Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001**). Por tal razón, la absorbancia del extracto de antocianinas se midió mediante un espectrofotómetro entre un rango de 260 a 760 nm en buffer de cloruro de potasio a pH de 1,0 y acetato de sodio a pH 4,5.

2.2.2.5.2.1 Preparación de Buffer con Cloruro de potasio 0,025 mol/L a pH1

Inicialmente, según (**Cuzcano, 2013**) se pesarán 0,186 g de KCl y se agregará agua destilada hasta aforar a 98 ml, luego se procederá a medir el pH de la solución Buffer con un pH-metro anticipadamente equilibrado, para luego ajustar la solución con 0,05 ml de HCl concentrado y finalmente ser diluida a 100 ml con agua destilada.

2.2.2.5.2.2 Preparación de Buffer con Acetato de sodio 0,4 mol/L a pH4

Según (**Cuzcano, 2013**), se pesarán 5,443 g de $C_2H_3NaO_2$ (acetato de sodio) y se agregará agua destilada hasta aforar a 96 ml, posteriormente se medirá el pH de la solución Buffer para ser ajustada con 0,52 ml de HCl y finalmente ser diluida a 100 ml con agua destilada.

Una vez preparado los buffers, a continuación, se realizó una dilución 1/50 de las muestras de extracto de *Hibiscus sabdariffa* con agua destilada, siendo necesario preparar un blanco con agua destilada antes de iniciar con las mediciones.

Luego se colocaron 0,3 ml de la dilución de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* en tubos de ensayo y se añadieron 0,6 ml de Buffer KCl 0,025 mol/l-pH1 por triplicado, así también, se procedió con 0,3 ml de la dilución de los extractos y se añadieron 0,6 ml de Buffer de $C_2H_3NaO_2$ (acetato de sodio) 0,4 mol/l-pH4,5 (**Zapata et al., 2014**). Seguidamente, las muestras se colocaron en el espectrofotómetro para obtener las lecturas de absorbancias a un rango de entre 200-760 nm, considerando como longitud de onda (vis-max) aquella que señale la lectura más elevada de las muestras a pH 1 de KCl 0,025 mol/l y a pH 4,5 de $C_2H_3NaO_2$, previamente establecidas.

Para la determinación de la absorbancia se emplea la siguiente ecuación propuesta por (Giusti & Wrolstad, 2001).

$$A = [(A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH1}} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH4.5}}]$$

Ecuación 3 Determinación de la lectura de absorbancia

Nota: El valor de $A_{\lambda \text{ vis-max}}$ en el experimento se observó a 522 nm como lectura más elevada en el espectrofotómetro (UV-VIS Fisher ThermoScientific)

2.2.2.6 Determinación del contenido de antocianinas

Se empleará la siguiente fórmula aplicada por (Giusti & Wrolstad, 2001).

$$\text{Contenido de Antocianinas totales} = (A * PM * FD * 1000) / (\epsilon * l)$$

Ecuación 4 Determinación del contenido de antocianinas totales

Siendo; A: la absorbancia de la muestra previa calculada,

PM: el peso molecular de la antocianina 449,6 g/l -,

FD: el factor de dilución que se empleará en la realización,

ϵ : el coeficiente de extinción molar ($26900 \text{ l cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

l, el grosor de la cubeta (1 cm),

y 1000: el factor de conversión de g a mg.

2.2.2.7 Microencapsulación de antocianinas mediante secado por aspersión con maltodextrina

El proceso de microencapsulación inició preparando el ensayo a una escala mayor tomando en cuenta el mejor ensayo realizado en las muestras anteriores en base a las condiciones óptimas y el disolvente adecuado (Riera A. , 2020). Cuando se obtuvo el extracto fue importante concentrarlo en un rotaevaporador (IKA-HB10) para continuar con el proceso de microencapsulación a una temperatura de 70°C y una velocidad de agitación de 230 min^{-1} , destilando de esta manera el disolvente y por otro lado obteniendo

el concentrado de antocianinas. Donde, al obtener la cantidad pretendida de concentrado se procedió a medir el volumen con una probeta y se llevó a refrigeración a 4 °C en un frasco ámbar para evitar la desecación del metabolito o algún tipo de contaminación.

Posteriormente, se preparó una mezcla de 10 g de maltodextrina junto con 20 ml del concentrado, tomando en consideración los resultados de sólidos totales para la cantidad de concentrado necesaria para la microencapsulación, donde se debería haber preparado mezclas de 10, 20 y 30 % de maltodextrina, sin embargo, ya que se manejó una cantidad medida del reactivo se llegó a considerar la carga de la molécula al 15 % siendo el porcentaje necesario de la matriz polimérica establecida para el proceso de microencapsulación (**Telenchana E. , 2019**). Posteriormente, se utilizó un equipo de secado por aspersión o Mini Spray Dryer, donde inicialmente se lo alimentó con la mezcla realizada, en condiciones adecuadas a una presión de (-50 mbar), temperatura de entrada de 150°C y de salida de 90°C controlada por el flujo de aire y agua (**Telenchana E. , 2019**).

Finalmente, se procedió con el secado donde la maltodextrina se solidificó actuando sobre las partículas del concentrado, formando microesferas. Cuando finalizó el proceso se apagó la temperatura de entrada dejando pasar una cierta cantidad de agua hasta que se regule la temperatura del sistema en 100 °C, seguidamente se cerró el flujo de aire y agua, para después, obtener el producto cuando la temperatura ya sea de 70 °C, desmontando el equipo y recuperando el resto de producto que se queda dentro del tanque de secado (**López Hernández, 2010**).

La determinación del rendimiento posterior al secado se calculó a partir de las determinaciones del peso de polvo que se obtiene en el proceso, donde se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{\text{gramos obtenidos}}{\text{gramos en la mezcla inicial}} \right) \times 100$$

Ecuación 5 Rendimiento de la muestra

2.2.2.8 Análisis de Espectrofotometría Infrarroja FT-IR

El análisis se realizó en el Laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, en donde se analizaron las muestras de antocianinas tanto del concentrado como del microencapsulado con maltodextrina en un espectroscopio infrarrojo como lo detalla (Telenchana E. , 2019) en su estudio de evaluación de la actividad antioxidante de berenjena, donde para la investigación se empleó un intervalo de frecuencia de barrido entre 4000 cm^{-1} y 550 cm^{-1} y un porcentaje de transmitancia entre 50 y 100 % de las muestras concentradas y microencapsuladas.

2.2.2.9 Determinación de la eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia de encapsulación se pesó aproximadamente 2,5 g del microencapsulado donde se mezcló con 15 ml de los disolventes (agua y etanol) respectivamente, siendo necesario disolver durante 10 minutos para ser colocados en cubetas y llevados al espectrofotómetro (Fisherbrand™ accuSkan™ GO) a 520 nm con el fin de obtener lecturas de absorbancia de cada muestra. Obteniendo valores que permitan calcular la concentración de las muestras extraídas y poder determinar la eficiencia del microencapsulado.

Se empleará la siguiente ecuación aplicada por (Telenchana E. , 2019) para la determinación de la eficiencia.

$$\text{Eficiencia de Encapsulación \%} = \frac{CT_{\text{agua}} - CS_{\text{etanol}}}{CT_{\text{agua}}} \times 100$$

Ecuación 6 Eficiencia de la Microencapsulación

Donde:

CT_{agua} : la concentración de antocianinas totales presente en las microesferas y

CS_{etanol} : la concentración de antocianinas superficiales presentes en las microesferas.

2.2.2.10 Determinación de la actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante de las antocianinas de *Hibiscus sabdariffa*, se empleó un método *in vitro*, descrito a continuación:

2.2.2.10.1 Capacidad antioxidante mediante el método de DPPH (*In vitro*)

La determinación de la capacidad antioxidante se basó en la utilización de una solución estándar del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo o DPPH, propuesta por (Bobo-García, y otros, 2015), donde el interés por este radical se enfoca en su susceptibilidad ya que posee un electrón que se encuentra desapareado y que a su vez reacciona con el compuesto antioxidante (Moreno, 2020).

Inicialmente, se realizó una curva de calibración como estándar a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de una solución madre de Trolox, donde se empleó como disolvente a una solución de etanol y agua en relación 50:50 (Riera A. , 2020).

Luego, para la medición de la actividad antioxidante se preparó una solución de 150 $\mu\text{mol l}^{-1}$ del reactivo DPPH, en una solución de metanol y agua en relación 80:20. Seguidamente, se llevó a cabo la preparación de diluciones 1/50 y 1/100 del extracto concentrado de Flor de Jamaica y del microencapsulado, donde se diluyó 0,1 g de cada muestra en 5 y 10 ml de agua destilada, respectivamente.

A continuación, se colocó las muestras diluidas sobre una Microplaca 96x0,1 ml, siguiendo el proceso aplicado por (Riera A. , 2020), donde para el blanco fue necesario ocupar 20 μL de agua destilada con 180 μL de solución agua y metanol, luego se realizó un control de referencia de 20 μL de agua destilada con 180 μL de solución DPPH y posteriormente se llevó 20 μL de las muestras diluidas de extracto concentrado y microencapsulado con 180 μL del reactivo DPPH. Finalmente, la absorbancia de cada muestra se obtuvo a una longitud de onda de 517 nm.

La ecuación que se empleará es la siguiente:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{AC-AM}{AC} \times 100$$

Ecuación 7 Determinación de la actividad antioxidante

Sin embargo, ya que la concentración se relaciona en función al porcentaje de inhibición del radical DPPH, se calculó mediante la siguiente fórmula desarrollada, aplicada por **(Moreno, 2020)**.

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

Ecuación 8 Porcentaje de inhibición del DPPH

Donde:

(A_m): Es la absorbancia del extracto concentrado de Flor de Jamaica y microencapsulado,

(A_c): la absorbancia de control, y

(A_b): la absorbancia del blanco reactivo.

A los valores de absorbancia obtenidos se los comparó con la curva estándar de Trolox, donde los datos fueron expresados en μmol equivalentes de Trolox por cada gramo de extracto seco.

2.2.3 Análisis estadístico

2.2.3.1 Diseño experimental

Para determinar el procesamiento de datos, el análisis de varianza y la selección del mejor tratamiento en el proceso de extracción de las antocianinas presentes en la Flor de Jamaica o *Hibiscus sabdariffa*, se aplicó un diseño experimental 2^2 (A x B), donde se estudió la influencia de dos factores: relación material vegetal / volumen de disolvente (Factor A), y el tiempo de extracción (Factor B), por triplicado en cada uno de los tratamientos, a través del diseño de Superficie de Respuesta, ya que permite examinar los modelos después de haber determinado los factores relevantes empleando diseños factoriales, especialmente si existe la sospecha de una curvatura en la superficie de respuesta **(Chacin, 2000)**. Además, se utilizó la prueba de múltiples rangos para estudiar el comportamiento de los tratamientos realizados en la investigación mediante el análisis de varianza y un ajuste de regresión con significancia ($\alpha=0,05$).

En la tabla 10. se muestra los factores y niveles del diseño experimental aplicado

Tabla 10 Estructura del diseño experimental 2^2 (A x B)

FACTORES (A x B)	NIVELES
A: Relación material vegetal / volumen de disolvente (Disolvente ₁ : agua, Disolvente ₂ : EtOH y HCl relación 85: 15)	R1: Relación 1:20
	R2: Relación 1:25
B: Tiempo (min)	T1: 15
	T2: 30

Nota: Se aplicó un diseño experimental para el análisis de datos, como el empleado por (Moreno, 2020).

En la tabla 11. se observa la distribución de los tratamientos realizados en el estudio

Tabla 11 Distribución de los tratamientos

INTERACCIÓN	TRATAMIENTO	DISOLVENTE
R1T1	Relación 1:20, 15 minutos a 85 °C	Agua
R1T2	Relación 1:20, 30 minutos a 85 °C	Agua
R2T1	Relación 1:25, 15 minutos a 85 °C	Agua
R2T2	Relación 1:25, 30 minutos a 85 °C	Agua

A través de la herramienta estadística Statgraphics Centurión Versión XVII. se analizaron los valores obtenidos de cada interacción realizada, debido a que está diseñado para facilitar el análisis estadístico de datos y el control estadístico de procesos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del mejor disolvente para la extracción de antocianinas

La extracción de antocianinas se ha convertido en una alternativa que permite ayudar a un mejor aprovechamiento de especies como la *Hibiscus sabdariffa*, ya que debido a sus múltiples beneficios y aportaciones en las áreas alimenticias y terapéuticas contribuyen a implementarla como un recurso innovador y económico que no requiere de altas tecnologías para su desarrollo (Sumaya Martínez et al., 2014).

Por lo tanto, en la presente investigación se realizó la extracción sólido-líquido de antocianinas según (Riera A. , 2020) a partir de cálices, tallos y flores de la (*Hibiscus sabdariffa* o Flor de Jamaica) analizando precisamente que tipo de disolvente (agua o etanol al 96 % con ácido clorhídrico 37 % en relación 85:15) propuesto por (Riera A. , 2020) es el que más influye en el proceso de extracción.

Dada la variabilidad cuantitativa entre los componentes de las distintas muestras, se procedió a realizar una prueba de múltiples rangos con el fin de estudiar la diferencia existente entre las medias de concentraciones de antocianinas con los distintos tipos de disolventes empleados. Asumiendo como variable de respuesta a la concentración de antocianinas presente en los extractos (Riera A. , 2020).

Primero, se determinó la longitud de onda (520 nm) aplicando un barrido espectral a un rango entre 380 a 650 nm, visualizando la variación de la absorbancia de las posibles antocianinas presentes en la muestra (Anexo 1). Según (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001), (Tanaka et al., 2013) y (Riera A. , 2020) en sus estudios coinciden que una longitud de onda de 520 nm corresponde a la Cianidina 3- glucósido.

A continuación, en la Figura 5 se presenta el diagrama de cajas y bigotes, donde se observa la medida de tendencias centrales y de dispersión sobre las muestras analizadas en los respectivos disolventes.

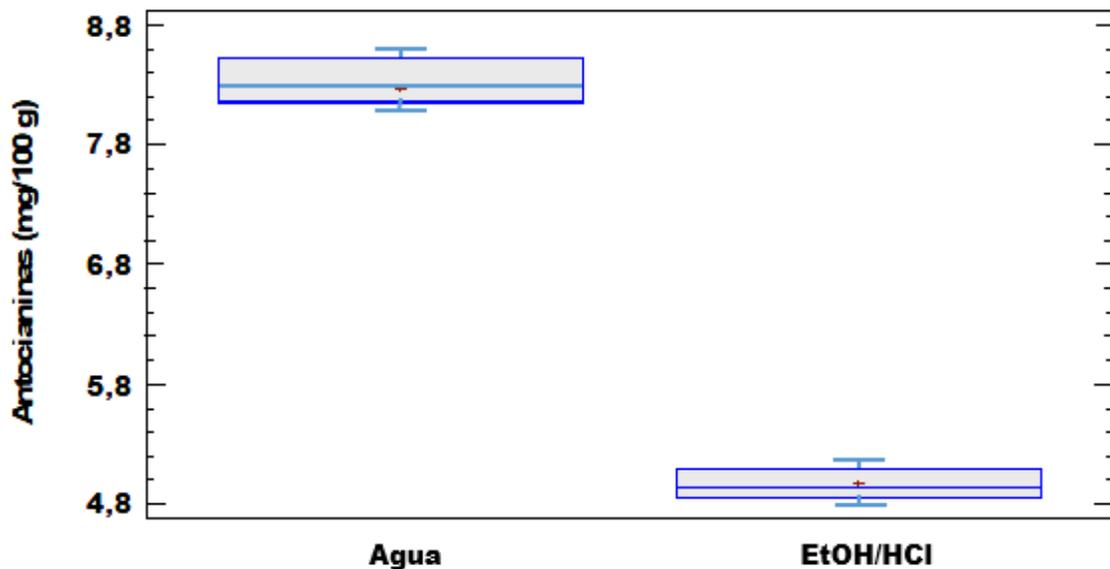


Figura 5 Diagrama de cajas y bigotes normalizado por la influencia de los disolventes aplicados en la extracción de antocianinas de Flor de Jamaica.

En la figura 5 se visualiza un diagrama representativo del análisis de datos de los diferentes tipos de disolventes empleados para el proceso de extracción. Señalando que en la figura se puede inferir que bajo la utilización como disolvente (etanol 96 % con HCl 37 %) se reportan valores de cifras bajas de concentración (4,854 mg/100 g) de antocianinas, con respecto al disolvente (agua), demostrando que existe diferencia significativa entre estos. Por tanto, el disolvente que mejor resultados presentó fue el agua con una concentración promedio de 8,278 mg/100 g de Cianidina 3-glucósido.

La influencia de factores como la relación material vegetal / volumen de disolvente (1:25), el tiempo (30 min) y la temperatura (85 °C) durante el proceso de extracción fueron variables que se manejaron en el estudio (Figura 6). No obstante, la temperatura dentro de la investigación fue la única variable común que se aplicó a todas las muestras realizadas, valorando que tiene una influencia significativa sobre la estabilidad de las antocianinas presentes de cada extracto. Sin embargo, (**Gorriti-Gutierrez et al., 2009**) mencionan que las condiciones de extracción con soluciones etanólicas mayores al 20%, presentan mejores resultados correspondientes a una temperatura de 75°C \pm 5 y a un tiempo de extracción de 120 y 240 minutos como se aplicó en el estudio de (**Riera A. , 2020**)

considerando como condiciones desfavorables aquellas que se realizan a 25°C y 30 minutos.

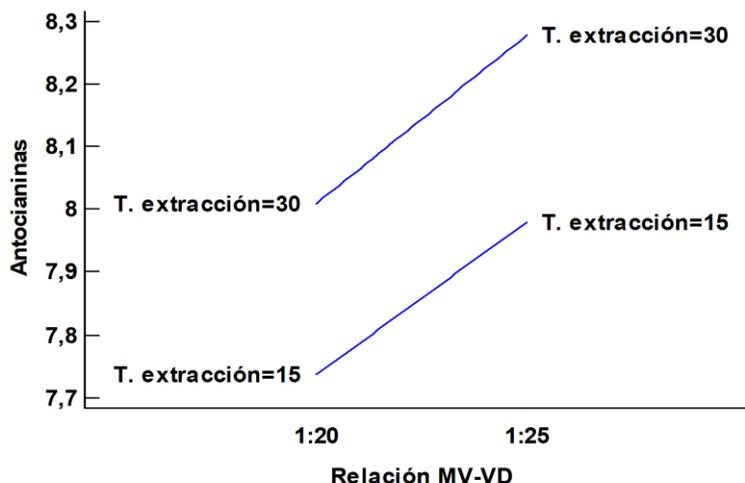


Figura 6 Diagrama de interacción del material vegetal / volumen de disolvente y el tiempo de extracción de antocianinas de Flor de Jamaica

Adicionalmente, la influencia del tiempo en el proceso de extracción sólido-líquido en la Figura 6 muestra un aumento de la concentración de antocianinas, señalando que tiene una tendencia creciente durante la extracción, ya que es un factor directo que participa significativamente en la optimización para el proceso de extracción de antocianinas, donde (Heras et al., 2013) mencionan que el tiempo ofrece un efecto mayor con relación al que genera la temperatura, sin embargo, después de un tiempo excesivo puede llegar a no ser significativo en relación al soluto de la matriz sólida o al solvente de extracción (Silva et al., 2007).

3.2 Obtención del extracto vegetal líquido

Para la determinación de las condiciones óptimas en el proceso de extracción de antocianinas a partir de Flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) se realizó un estudio a escala mayor y con la influencia de dos factores tales como: Factor A (relación material vegetal / volumen del disolvente) y (Factor B) el tiempo de extracción sobre las muestras realizadas, a través de un diseño experimental de superficie 2^2 donde se cuantificó el contenido de antocianinas de cada tratamiento. (Anexo 2)

Para la cuantificación del contenido de antocianinas, se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis, como técnica simple y el método por pH diferencial como una más exacta, donde **(Bridgers et al., 2010)** mencionan que existen diversos métodos para la determinación de antocianinas como el metanol acidificado, extracción asistida por microondas, extracción con fluidos presurizados entre otros. Sin embargo, la espectrofotometría UV-Vis es empleada como una técnica de mayor frecuencia debido a su bajo costo y al corto tiempo de análisis.

Los resultados del análisis de varianza (Anexo 3) demostraron que el factor A como el factor B, presentan una influencia significativa en la extracción de antocianinas, como factores aplicables de manera individual con un valor de ($p < 0,05$) para un 95 % de confianza, mientras que su interacción AB presentó un valor de ($p > 0,05$) resaltando que no influye de manera significativa en la respuesta experimental. Por lo tanto, **(Telenchana E. , 2019)** señala que la proporción de material vegetal / volumen de disolvente (1 parte masa vegetal / 25 partes de agua) y a tiempo 30 minutos fue la adecuada para conseguir un equilibrio donde el soluto se disuelve totalmente en el disolvente, sin obtener extractos muy diluidos.

Según **(Galicía et al., 2008)** establecen que para la extracción de antocianinas con disolvente agua, es conveniente emplear la proporción (1 parte de masa vegetal / 10 partes volumen de disolvente) entre 15 y 60 min, considerando como t_0 al tiempo donde la mezcla alcanzó la ebullición plena, en este estudio se utilizaron dos tiempos de extracción 15 y 30 minutos, además de emplear proporciones de 1/20 y 1/25 en cada muestra respectiva.

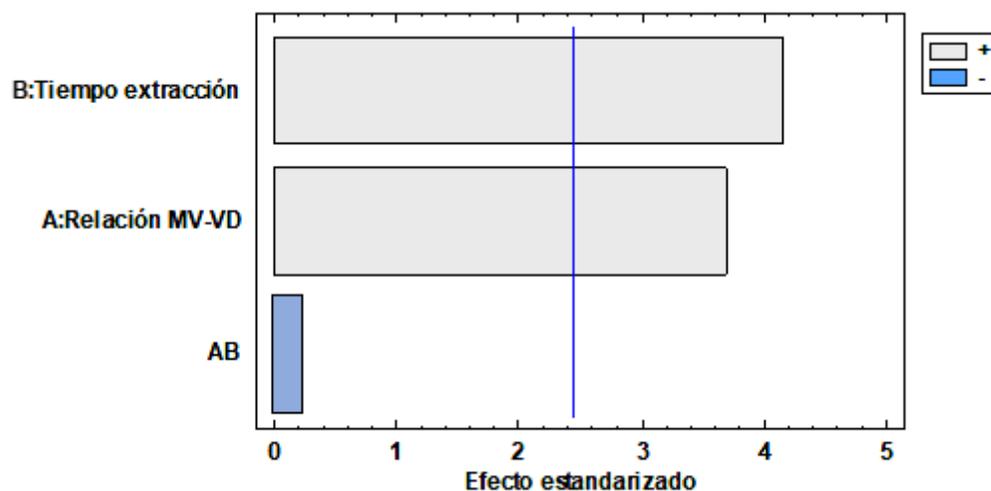


Figura 7 Diagrama de Pareto estandarizado de los factores que presentan influencia en el proceso de extracción

El diagrama de Pareto que se visualiza en la figura 7, establece la interacción de los factores A y B definidos en el presente estudio, donde se observa que ambos factores sobrepasan el efecto estandarizado, comprobando así que la relación material vegetal / volumen de disolvente y el factor tiempo según (Telenchana E. , 2019) influyen significativamente en el proceso de extracción de antocianinas, por otra parte, la interacción de los factores AB, es menor al efecto estandarizado y no presenta una influencia significativa, además, se logró obtener un modelo de ajuste r^2 de 85,34 %.

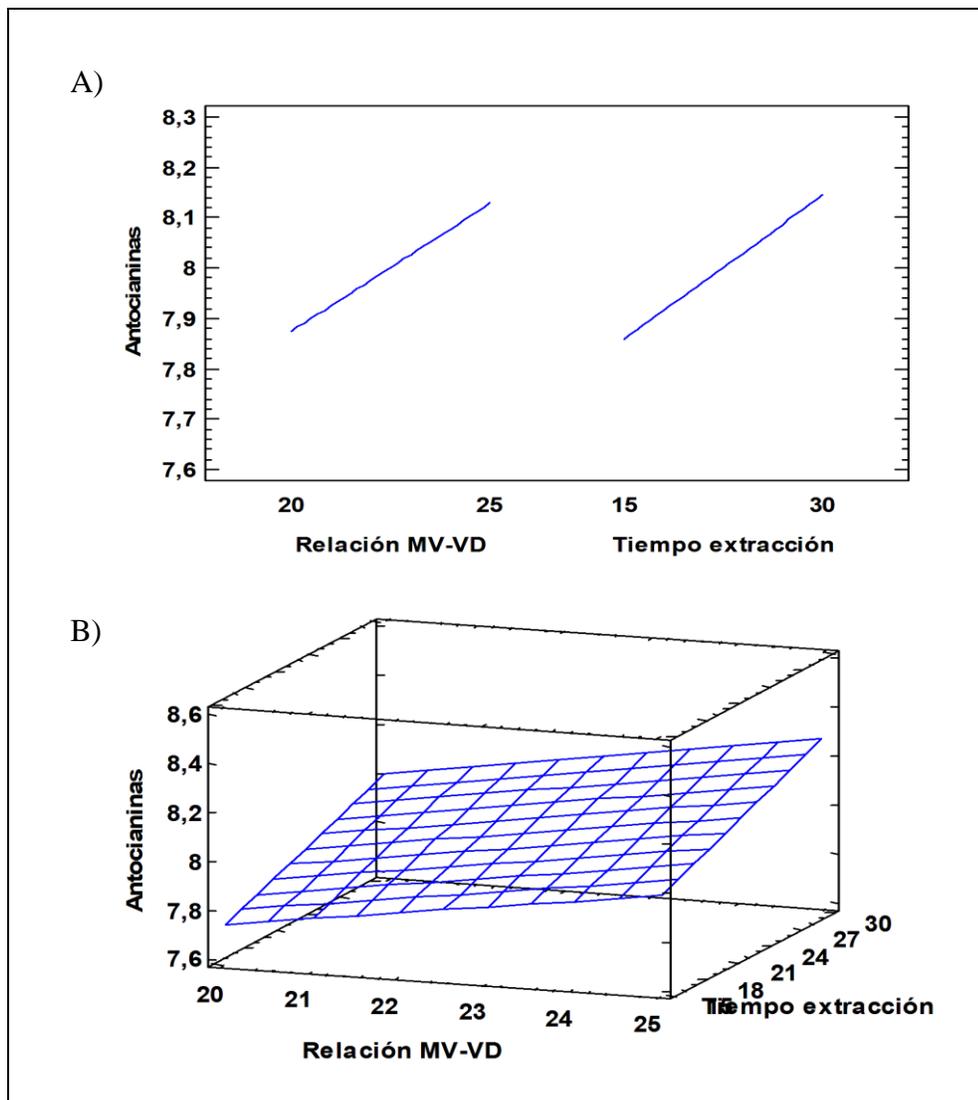


Figura 8 . A) Gráfico de efectos principales para la concentración de antocianinas; B) Superficie de respuesta estimada para la concentración de antocianinas (mg/100 g); método empleado por (Moreno, 2020).

Por otra parte, la gráfica de la Figura 8A, demuestra que se alcanza una mayor concentración de antocianinas a la relación 1:25 y un tiempo de extracción de 30 minutos a temperatura de 85 °C, siendo una relación directamente proporcional mientras mayor sea la relación material vegetal / volumen de disolvente aumenta la concentración de antocianinas (Moreno, 2020), ocurriendo de manera similar con el tiempo, este resultado es comprobado por el gráfico de Superficie de respuesta (Figura 8B). Según (Gunaraj &

Murugan, 1999) este tipo de gráficos representa los efectos directos y condiciones operativas deseables mediante gráficos bidimensionales y tridimensionales, por ende la Figura 8B representa de manera tridimensional la interacción que existe entre los factores A y B, confirmando que la concentración más alta en el proceso de extracción de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* se obtiene con una relación 1:25 material vegetal / volumen de disolvente y durante un tiempo de 30 minutos de ebullición a una temperatura constante, obteniendo una concentración máxima de 8,278 mg/100 g. Según (**Galicía et al., 2008**) en su estudio de caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica, establecen que la concentración de antocianinas en diferentes tipos de Flores de Jamaica oscila entre 6,1 y 12,4 mg/100 g, dependiendo del tipo de disolvente y tiempo de extracción, recomendando aplicar una temperatura de 70 °C a 60 minutos con disolvente agua para una óptima extracción (**Moreno, 2020**).

Finalmente, después de analizar la relación material vegetal / volumen de disolvente se determina que básicamente no existe una saturación del disolvente, por tanto, es aconsejable realizar un análisis en función de mayores relaciones, con el objetivo de lograr una mayor concentración de antocianinas.

3.3 Microencapsulación de antocianinas

La microencapsulación consiste en el aislamiento de sustancias activas con el fin de obtener productos con una forma esférica y un tamaño micrométrico (**Ko et al., 2002**), donde las cápsulas llegan a liberar su contenido a velocidades que suelen ser controladas bajo condiciones específicas (**Nesterenko et al., 2013**). Para el proceso de microencapsulación se aplicó el método de secado por aspersion o *Spray Drying*, donde el resultado fue un polvo constituido por partículas en forma de microesferas, donde (**Cano et al., 2015**) y (**Riera A. , 2020**) mencionan que la calidad de las partículas depende de las características que presente la solución (viscosidad y velocidad de flujo), el aire de secado (temperatura, presión), el tipo de atomizador y el contacto entre el aire caliente y las gotas dentro de la cámara de secado. En el estudio se empleó el aire como gas y las condiciones previamente establecidas para la microencapsulación.

Dentro del estudio un parámetro importante en el proceso de secado por aspersión es la temperatura de entrada ya que este permite que suceda la evaporación de la solución, donde **(Esquivel-González & Quiñones, 2015)** mencionan que una temperatura baja en este proceso genera una baja velocidad de evaporación produciendo que las microesferas sean capaces de agruparse, conteniendo un alto contenido de agua en su interior junto con poca fluidez. Por el contrario, **(Riera A. , 2020)** señala que una temperatura alta de entrada produce una vaporización excesiva rompiendo de esta manera la membrana e induciendo a una degradación de los componentes del microencapsulado. En el estudio se utilizó la maltodextrina como matriz polimérica debido a sus ventajas como su baja viscosidad a altas concentraciones y solubilidad en agua, seguidamente se obtuvieron los microencapsulados deseados (Anexo 6) donde fue necesario esperar unos minutos para que el sistema regulara la temperatura para poder extraer las microesferas.

A continuación, se determinó el rendimiento del microencapsulado de antocianinas, con los resultados que se observan en el (Anexo 5), donde el peso final conseguido del secado, fue de 6,742 g, seguidamente al desarrollar el cálculo del rendimiento con la ecuación 6 obtenemos un valor de 67,42 %, siendo un valor no tan alto puesto que al momento del secado una cierta cantidad del producto microencapsulado se queda sujeto a las paredes del equipo, produciendo que se quemó debido a la ausencia en equipos de laboratorio de martillos neumáticos.

3.3.1 Análisis estadístico de comparación de concentraciones

A continuación, en la Figura 9 se observa el gráfico estadístico de comparación de las concentraciones de antocianinas del extracto líquido (sin microencapsular) y el concentrado microencapsulado del estudio realizado.

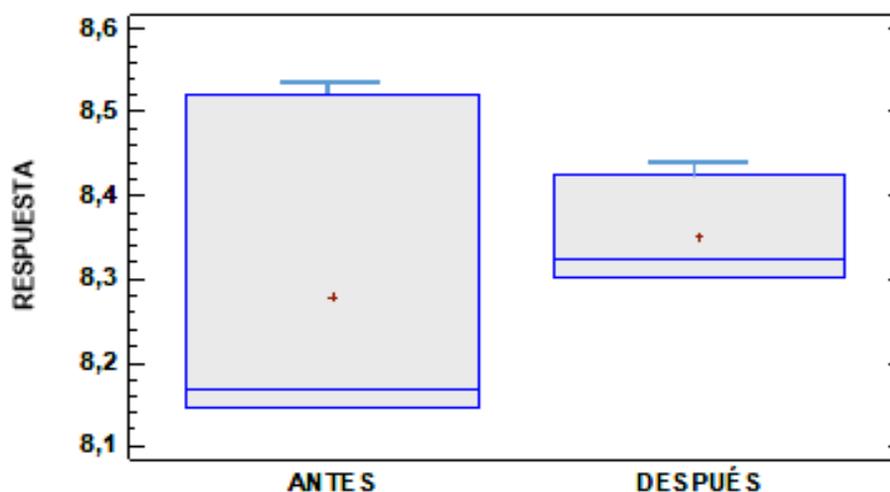


Figura 9 Resultados de la comparación de concentraciones de antocianinas antes y después de microencapsular.

Debido a que solo se empleó un polímero (maltodextrina), en el proceso de microencapsulación se realizó una comparación estadística de las concentraciones de antocianinas sin microencapsular y las microencapsuladas, puesto que en el Anexo 8, se observa un análisis de varianza aplicado a las muestras antes y después de microencapsular, donde se refleja un valor P mayor que 0,05; comprobando con la gráfica que no existe diferencia significativa entre las muestras evaluadas (microencapsulado y sin microencapsular), en otras palabras, el polímero utilizado para el proceso de microencapsulación no afectó a los componentes de la muestra.

3.4 Análisis de la eficiencia de microencapsulación de las antocianinas

El proceso de microencapsulación empleando maltodextrina según (Domínguez, 2012) y (Ramos, 2019) reduce la viscosidad de una dispersión, lo que ocasionó en el estudio que el microencapsulado posea gran solubilidad en agua. En la tabla 6 se presentan los resultados de la determinación de la eficiencia de microencapsulación, donde el mayor porcentaje alcanzado fue del 88,02 %. Es posible que la eficiencia alcanzada en la investigación se debió a los parámetros de microencapsulación en el proceso de secado (temperatura de entrada 150 °C y temperatura de salida 90 °C). Los resultados casi coinciden con lo mencionado por (Sotomayor & Vargas, 2017) quienes señalan que mientras la temperatura de entrada esté entre 150 – 180 °C, la eficiencia será mayor, ya

que influye de manera directa sobre la eficiencia del microencapsulado de las antocianinas de Flor de Jamaica.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos de la eficiencia

Tabla 12 Resultados de la eficiencia de microencapsulación

Dilución 1/100	Absorbancia (520 nm)	Concentración promedio (mg/100 g)	Eficiencia de encapsulación (%)
Agua (total)	0,3875	8,912	86,55
Etanol (superficial)	0,3901	1,198	
Agua (total)	0,3882	8,972	87,88
Etanol (superficial)	0,0401	1,087	
Agua (total)	0,0364	8,928	88,02
Etanol (superficial)	0,0358	1,069	

Nota: Se prepararon las diluciones con respecto al método desarrollado por (Ramos, 2019).

3.5 Análisis por espectrofotometría infrarroja FTIR

Se realizó un estudio comparativo a través de la espectroscopia infrarroja IR, para obtener un análisis de la eficiencia del microencapsulado y las muestras de antocianinas sin microencapsular, mediante una gráfica espectral que relacionó la cantidad de radiación IR que atravesaron las microesferas con la longitud de onda (**Riera A. , 2020**), observando la posición de los picos de cada grupo funcional presente en las muestras de Flor de Jamaica, por tanto, mediante la aplicación de la técnica de espectrofotometría infrarroja FTIR se logró determinar la presencia de diferentes compuestos antocianos presentes en la *Hibiscus sabdariffa*, tales como la delfnidina-3-sambubiósido, delfnidina-3-glucósido, cianidina-3-sambubiósido (**Mahadevan et al., 2009**). En la Figura 10 se observa los espectros de las antocianinas sin microencapsular, encapsuladas (microesferas) y el polímero empleado (maltodextrina) a un rango espectral de 4000 cm⁻¹ a 550 cm⁻¹.

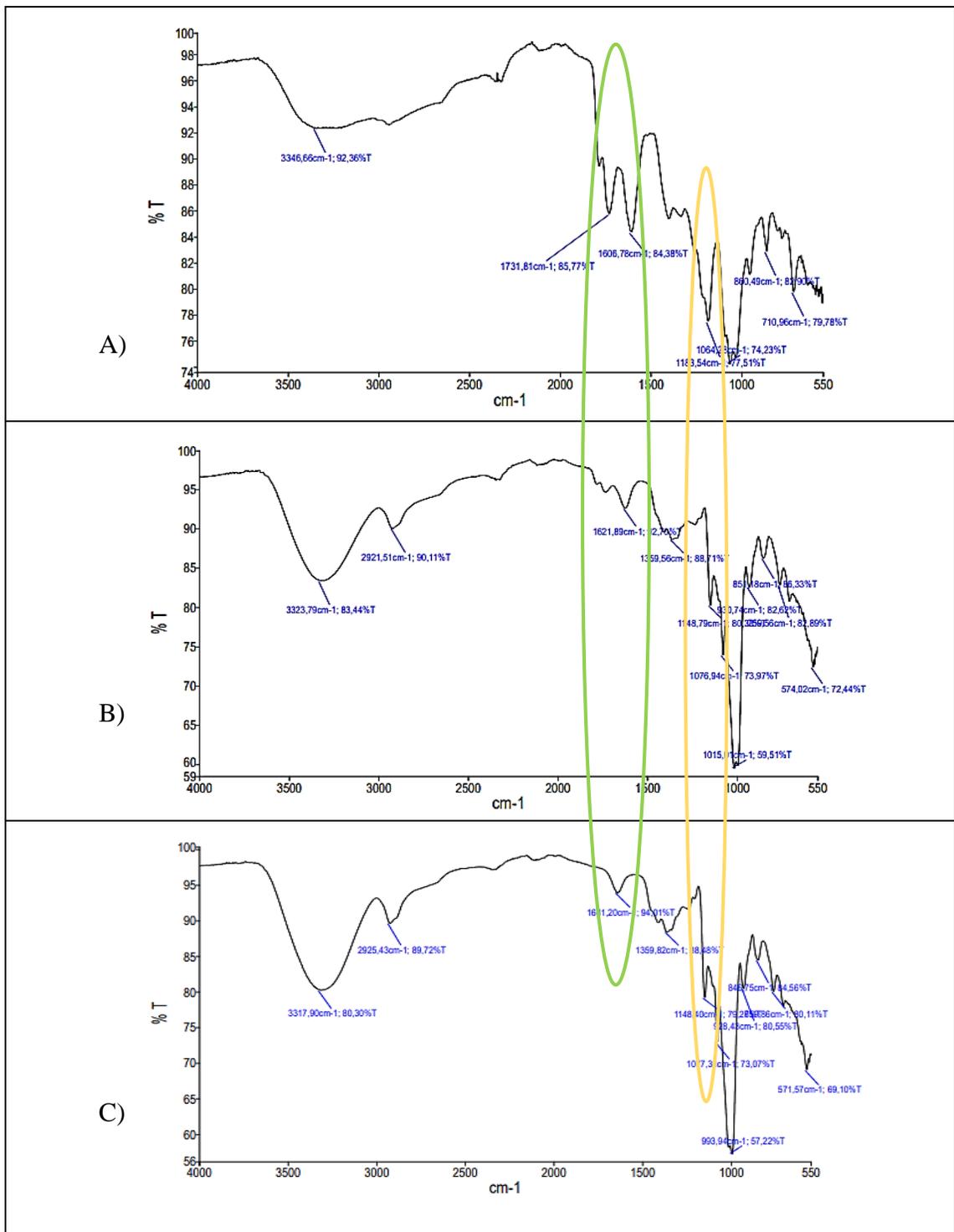


Figura 10. Espectrofotometría infrarroja FT-IR de las muestras analizadas entre 4000 cm^{-1} a 550 cm^{-1} .

Nota: Se observan los espectros de antocianinas sin microencapsular (A), microencapsuladas (B) y de la matriz polimérica maltodextrina (C).

Según (Taib et al., 2019), la presencia de grupos funcionales en un análisis de espectrofotometría infrarroja FT-IR, presentan características de absorción a un rango entre 1790 cm^{-1} a 800 cm^{-1} , característico de una posible estructura antociánica. El análisis espectroscópico FTIR en la muestra sin microencapsular permitió apreciar notoriamente el pico de banda ancha característico del grupo funcional hidroxilo a un rango espectral de 1731 cm^{-1} a 1621 cm^{-1} (elipse verde) y también un pico definido a un rango espectral de $1183,54\text{ cm}^{-1}$ a $1148,79\text{ cm}^{-1}$ propio de un grupo carbonilo (elipse amarilla).

Las antocianidinas como la delfinidina 3-sambubiósido y cianidina 3-sambubiósido, responsables de reflejar el color rojo, según (Da-Costa et al., 2014) son observables a un rango espectral de 1202 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} , correspondiente a cationes flavilios, lo que permitió inferir que en la muestra de antocianinas de Flor de Jamaica existe la presencia no solo de Cianidina 3-glucósido sino también de otro tipo de antocianidinas con actividad antioxidante.

La figura 10A reflejó un pico de banda ancha donde existe la presencia clara de antocianinas a un rango espectral de 1731 cm^{-1} , sin embargo al comparar con la Figura 10B se apreció que el pico desaparece su intensidad al encontrarse la muestra microencapsulada por el polímero, por tanto, se puede deducir que el proceso de encapsulación fue exitoso. Por otra parte, la Figura 10C perteneciente al material encapsulante (maltodextrina) no presentó un pico definido a la frecuencia de la Figura 10A confirmando que fue favorable la microencapsulación. Por ende, el material encapsulado se encuentra protegido de factores como la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad en condiciones de procesamiento y empaçado.

3.6 Determinación de la actividad antioxidante (*in vitro*)

Para determinar el potencial antioxidante en el concentrado y microencapsulado se utilizó el ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) propuesto por (Bobo-García et al., 2015) donde se explica la reducción del radical libre en presencia de compuestos bioactivos los cuales son donadores de hidrógeno, siendo el caso de las antocianinas debido a su poder antioxidante. (Guija et al., 2015). Por tanto, se realizó un análisis de

varianza (Anexo 9) para este ensayo, con un 95 % de confianza, donde los resultados arrojaron un valor de ($p < 0,05$), expresando que existe una diferencia significativa entre el concentrado y el microencapsulado. Para (Barragán et al., 2018) la molécula de DPPH al poseer un electrón desapareado, toma un tono característico violeta, pero al reaccionar con un compuesto antioxidante su tonalidad tiende a decaer, evidenciándose en las muestras realizadas una declinación en su tonalidad, dicho cambio llegó a ser cuantificado como la capacidad antioxidante a una absorbancia de 515 nm.

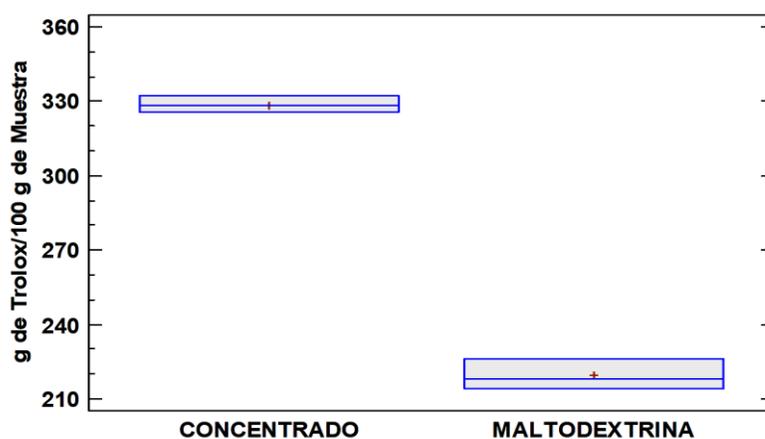


Figura 11. Diagrama de cajas y bigotes: comparación de la actividad antioxidante (*in vitro*) del concentrado y microencapsulado

En la Figura 11 se observa una comparación entre la muestra de concentrado de antocianinas y la muestra microencapsulada, donde se aprecia una mayor capacidad antioxidante, por parte del concentrado, ya que en la muestra concentrada las antocianinas se encontraban libres sin ningún tipo de elemento envolvente, por el contrario a la muestra microencapsulada con maltodextrina (Telenchana E. , 2019). Utilizando la ecuación 8, se logró calcular el porcentaje de inhibición, estos datos fueron graficados frente a los μmol de Trolox, donde a partir de la regresión lineal (Anexo 10), se determinaron los valores en promedio de 328,41 y 219,29 respectivamente, estos valores representan la capacidad de inhibición de cada muestra. Según (Arrazola et al., 2014) en su estudio de microencapsulación ratifican los resultados obtenidos de 252,8 μmol Trolox/g de microencapsulado, lo que nos asegura comparar la valoración de nuestros resultados.

3.7 Verificación de la Hipótesis

Se analizó los datos obtenidos de las antocianinas microencapsuladas de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

- Se rechaza la hipótesis nula
- Se acepta la hipótesis alternativa, es decir las antocianinas microencapsuladas de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) presentan actividad antioxidante.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La influencia del tiempo a 30 minutos durante el proceso de extracción sólido-líquido de las antocianinas de Flor de Jamaica, produjo un efecto significativo para la obtención de una alta concentración de antocianinas manteniendo una temperatura constante de 85 °C.
- Se microencapsularon las antocianinas de Flor de Jamaica mediante el secado por aspersion a condiciones óptimas de temperatura de entrada 150 °C y temperatura de salida 90 °C donde se alcanzó una eficiencia de microencapsulación del 88,02 % y un rendimiento del 67,42 % debido a la pérdida de producto microencapsulado sujeto a las paredes del equipo.
- Se evaluó la concentración de antocianinas presentes en el extracto mediante el espectrofotómetro UV-Vis obteniendo una concentración máxima de 8,521 mg/100 g de Cianidina 3-glucósido en relación material vegetal / volumen de disolvente 1:25, a tiempo de 30 minutos y temperatura constante de 85 °C.
- Se determinó la capacidad antioxidante de las antocianinas presentes en el concentrado y microencapsuladas mediante un ensayo *in vitro*, utilizando el radical libre DPPH, donde se arrojó como resultados 328,41 y 219,29 μmol equivalentes de Trolox/g de microencapsulado. Por lo cual, se concluye que las antocianinas de Flor de Jamaica microencapsuladas con maltodextrina presentan actividad antioxidante.

4.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda microencapsular las antocianinas extraídas empleando diferentes tipos de polímeros para contrastar su eficiencia.
- Se recomienda realizar una evaluación de la capacidad antioxidante de las antocianinas presentes en la Flor de Jamaica a través de un ensayo *in vivo* que permita analizar el comportamiento que causa sobre un microorganismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, M., & Hucl, F. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3), 350-354. doi:<https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- Ajay, M., Chai, H., Mustafa, M., & Gilani, A.-H. (2007). Mechanisms of the anti-hypertensive effect of Hibiscus sabdariffa L. calyces. En A. Viljoen, *Journal of Ethnopharmacology* (págs. 388-393). California: HerbaZest editorial team.
- Alonso, J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. *Corpus Libros*, 78-81.
- Andersen, O., & Jordheim, M. (2006). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Flavonoids chemistry, biochemistry and application.*, 471-551.
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por aspersión y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. *Informacion Tecnologica*, (25)(3), 31-42. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>
- Babalola, S., Babalola, A., & Aworth, O. (2001). Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of Food Technology in Africa*, 6, 133-134.
- Badreldin, A., Wabel, N. A., & Blunden, G. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. *Phytotherapy Research*, 369-375.
- Barragán, M., Aro, J., Huamaní, V., & Cartagena, R. (2018). Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mio – mio (*Coriaria ruscifolia* L.), *Technology Information*, (20)(4), 419-428. doi:<https://doi.org/10.18271/ria.2018.419>

- Bazzano, L., He, J., Ogden, L., Loria, C., Vupputuri, S., Myers, L., & Kruger, W. (2002). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93-99.
- Bermúdez, M., Díaz-Moreno, C., & Fuenmayor, C. (2016). *Evaluation of antioxidant components of ethanol extracts of the corozo exocarp (Bactris guineensis L.)*. Barranquilla-Colombia: Fischer.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Virseda, 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*, 1(95), 204-209. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bridgers, E., Chinn, M., & Truong, V. (2010). Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial: Crops and Products*, 54-60.
- Cadena, R., Bautista, A., Ortega, A., Welti, J., & Lozada, D. (2008). Cambios en contenido de compuestos fenólicos y color de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) sometidos a calentamiento con energía de microondas . *Universidad de Alicante*, 84-97.
- Cano, D., Villa, H., & Nicoletti, V. R. (2015). Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic , maltodextrin and modified starch OF turmeric oleoresin ... BINARY AND TERNARY BLENDS OF GUM ARABIC , MALTODEXTRIN AND MODIFIED STARCH. *Food Science and Technology*, 39-45. doi:<https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000200009>
- Castañeda, A., Rodríguez, J., Galán, C., & Sánchez, S. (2008). Estudio De Efectos Que Afectan La Estabilidad De Antocianinas Y Piranoantocianinas En Solución Acuosa Mediante Herramientas Estadísticas. *Memorias in Extenso XXII Congreso*

Nacional de Química Analítica, 177-182. Obtenido de https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_FisicAlim/Araceli_Ovan/8.pdf

- Cavalcanti, R., Santos, D., & Meireles, M. A. (2011). *Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview*. Brazil: Elsevier.
- Chacin, L. (2000). *Diseño y Análisis de Experimentos para generar Superficies de Respuesta*. Universidad Central de Venezuela , Facultad de Agronomía. Maracaibo: Epsilon Works.
- Csernoch, C., Gallo, A., & Mazzobre, M. (2018). *Optimización de Microcápsulas de Antocianinas y Maltodextrina por Liofilizado*. Argentina: Conicet Digital.
- Cuzcano, A. (2013). *Antocianinas a partir de la flor de jamaica (Hibiscus Sabdariffa L.)*. Perú-Lima: Universidad Nacional de Ingeniería.
- Da-Costa, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165, 424-443. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>
- Dolara, L., De Filippo, F., Giovannelli, C., Cecchini, S., & Orpianesi, C. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Food Science Tech*, 37-46.
- Domínguez, A. (2012). Microencapsulación De Lactobacillus Casei Atcc334 Utilizando Mezclas De Almidón De Amaranto Modificado Y Maltodextrina Como Material De Pared, Mediante Secado Por Aspersión Y Su Viabilidad En La Leche En Polvo". *Doctoral Dissertation*, 56-64.
- Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). *Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (Daucus carota L.) by spray drier*. Turquia: Elsevier Science.

- Esquivel-González, B., & Quiñones, R. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.*, 180-192.
- Fernández-Arroyo, S., Rodríguez-Medina, I., Beltrán-Debón, R., Pasini, F., Joven, J., Micol, V., . . . Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Res. Int.*, 90-95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040>.
- Figuroa, M. d., Ortega-Regules, A. E., & Anaya-Berrios, C. (2010). Piranoantocianinas: Modificaciones estructurales de antocianinas. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* , 84-95.
- Galicia, L., Salinas, Y., Espinoza, B., & Sánchez, C. (2008). *Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) Nacional e Importada*. México-Texcoco: Revista Chapingo.
- Garzón, A. (2008). Las Antocianinas como colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos. *Acta Biológica Colombiana*, 27-36.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. Vol. 40, Issue 9, 1107-1121.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., & Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 361-367.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Reserch Gate*, 34-38. doi:[doi:10.1002/0471709085.ch18](https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18)

- González-Stuart, A. (2010). Multifaceted Therapeutic Value of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L. Malvaceae). *Nutrients, Dietary Supplements, and Nutraceuticals*, 215-226.
- Gordillo, B., Rodríguez, F., Escudero, L., González, L., & Heredia, F. (2012). Comprehensive Colorimetric Study of Anthocyanic Copigmentation in Model Solutions. Effects of pH and Molar Ratio. *Food Colour and Quality Laboratory*, 60-66.
- Gorriti-Gutierrez, A., Quispe, J., Torge, L., Arroyo, A., Córdova, R., & Jurado, T. (2009). Extracción de antocianinas de las corontas de Zea mays L. “Maíz morado”. *Ciencia e Investigación.*, 2((12)), 64-74.
- Gunaraj, V., & Murugan, N. (1999). Application of response surface methodology for predicting weld bead quality in submerged arc welding of pipes. *Journal of Materials Processing Technology*, (1)(88), 266-275. doi:[https://doi.org/10.1016/S0924-0136\(98\)00405-1](https://doi.org/10.1016/S0924-0136(98)00405-1)
- Hale, B., Galli, R., Meterko, V., Carey, A., Bielinski, D., & McGhie, T. (2005). Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and stress. *Age the Journal of American Aging Association*, XIII(2), 49-57. doi:10.1007/s11357-005-4004-9
- 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.). *Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de vegetales.*, I(3), 12-16.
- Hidalgo V., S., Cifuentes R., W., Ruano S., H., & Cano C., L. (2009). Caracterización de trece genotipos de rosa de Jamaica Hibiscus sabdariffa en Guatemala. *Agronomía mesoamericana*, 101-109.
- Ko, J., Park, H., Hwang, S., Park, J., & Lee, J. (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*.(249), 165-174.

- Kong, J., Chia, T., Goh, N., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, vol. 64, 923-933. Obtenido de Obtenido de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v24n5/art11.pdf?fbclid=IwAR3UyJy05Rt>
- Lee, M., Chou, F., Tseng, T., Hsieh, M., Lin, M., & Wang, C. (2002). Hibiscus protocatechic ácido or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21-30.
- López Hernández, O. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*, 3(44), 381-389.
- Mahadevan, N., Shivali, H., & Pradeep, K. (2009). Hibiscus sabdariffa Linn. An overview. *Natural Product Radiance* 8, 77-83.
- Martínez, J., Bernal, H., & Cáceres, A. (2000). Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. *Rev Cuba. Plant Med*, 125-128.
- Menzies, I. J., Youard, L. W., Lord, J. M., Carpenter, K. L., Van Klink, J. W., & Perry, N. B. (2016). Leaf colour polymorphisms: a balance between plant defence and photosynthesis. *Journal of Ecology*, 104-113. doi:<https://doi.org/10.1111/1365-2745.12494>
- Mojiminiyi, F., Adegunloye, B., Egbeniyi, Y., & Okolo, R. (2000). An investigation of the diuretic effect of an aqueous extract of the petal of Hibiscus sabdariffa. *Pharm Belg Med Sci*, 77-80.
- Moreno, L. (2020). *Extracción y microencapsulación de antocianinas con actividad antioxidante y antiinflamatoria obtenidas a partir de fréjol rojo (Phaseolus vulgaris L.)*. Tesis de grado: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.
- Navas, M. J., Jiménez-Moreno, A. M., Bueno, J. M., Sáez-Plaza, P., & Asuero, A. G. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part IV: Extraction of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 313-342.

- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *OATAO*, 469-479.
- Ortiz, S. (2008). Composicion en macronutrientes, minerales y metales pesados en calices de Jamaica cultivada en el Estado de Monagas. *Rev. Voces Tecnol. y Pensam.*, 61-75.
- Ozela, E., Stringheta, P. C., & Chauca, M. (2007). Stability of anthocyanin in spinach vine (*Basella rubra*) fruits. *Cienc. Inv. Agr. [online]*., vol.34, n.2, 115-120. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202007000200004>.
- Ramos, E. (2019). *Extracción y Microencapsulación de antocianinas a partir de col morada (Brassica oleracea L.)*. Tesis de Grado: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de file:///C:/Users/USERX/Downloads/tesis%20alimentos%20berenjena.pdf
- Riera, A. (2020). *“Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de la planta sangorache”*. Tesis de grado: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de file:///C:/Users/USERX/Downloads/tesis%20ANGELA%20RIERA.pdf
- Rigon, R., & Zapata, N. (2016). Microencapsulation by spray-drying of bioactive compounds extracted from blackberry (*rubus fruticosus*). *Journal of Food Science and Technology*, 1515-1524.
- Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (01 de 08 de 2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Obtenido de Current Protocols in Food Analytical Chemistry: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.faf0101s00>
- Salinas, Y., Martínez, F., Soto, M., Ortega, R., & Arellano, J. L. (2003). EFECTO DE LA NIXTAMALIZACIÓN SOBRE LAS ANTOCIANINAS DEL GRANO DE MAÍCES PIGMENTADOS. *Redalyc*, 617-620.

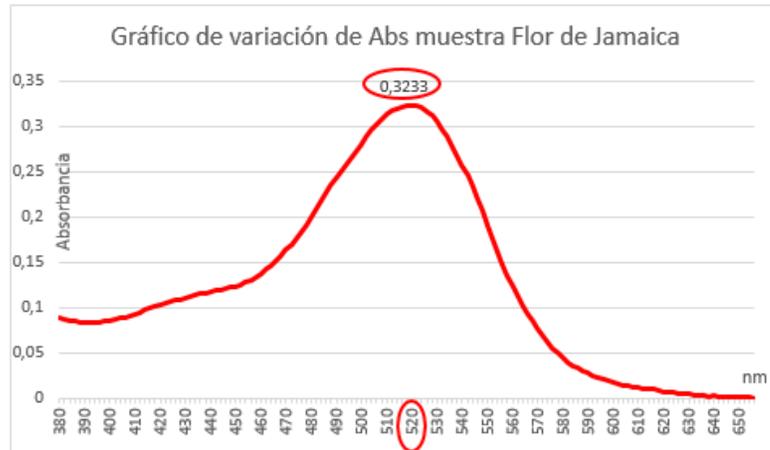
- Sáyago, S., Arranz, S., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Dietary Fiber Content and Associated Antioxidant Compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L) Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7886-7890.
- Sharapin, N. (2000). Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia*, 197-203.
- Shiraishi, M., Yamada, M., & Ueno, N. M. (2007). *A Rapid Determination Method for Anthocyanin Profiling in Grape Genetic*. Japon: Department of Grape and Persimmon Research National Institute of Fruit Tree Science.
- Silva, M., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, (3)(55), 381-387.
- Sindi, H., Marshall, L., & Morgan, M. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chem.*, 23-29. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097>.
- Sotomayor, M., & Vargas, D. (2017). Optimización de extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de antocianinas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) mediante secado por aspersión. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano*, 78-84. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/2cefabfa-4777-438c-a729-bbf7984c5add/content>
- Souza, A., Hidalgo, D., Pontes, S., Gomes, F., Cabral, L., & Tonnon, R. (2018). Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 91, 286-292. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.053>
- Stintzing, F., Stintzing, A., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. (2002). Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-based Anthocyanin Pigments. *Agric Food Chem.*, 6172-6181.

- Stringheta, P. C. (1991). Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). *Chem and Bio Tech*, 67-70.
- Sumaya Martínez, M. T., Medina Carrillo, R. E., Machuca Sánchez, M. L., Jiménez Ruiz, E., Balois Morales, R., & Sánchez Herrera, L. M. (2014). POTENCIAL DE LA JAMAICA (*HIBISCUS SABDARIFFA L.*) EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 1082-1088.
- Taib, S., Shameli, K., Nia, P., Etesami, M., Miyake, M., & Ali, R. e. (2019). Electrooxidation of nitrite based on green synthesis of gold nanoparticles using *Hibiscus sabdariffa* leaves. *Taiwan Inst Chem Eng*, 616-626.
- Tanaka, J., Kadokaru, T., Ogawa, K., Hitoe, S., Shimoda, H., & Hara, H. (2013). Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and the constituent delphinidin glycoside inhibit photoreceptor cell death induced by visible light. *Food Chem*, 129-139. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.036.
- Telenchana, E. (2019). *Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de antocianinas microencapsuladas a partir de cáscaras de berenjena (Solanum melongena)*. Tesis de Grado: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Obtenido de file:///C:/Users/USERX/Downloads/tesis%20erika%20telenchana.pdf
- Usoh, I., Akpan, E., Etim, E., & Farombi, E. (2005). Antioxidant actions of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa L.* on sodium arsenite -induced oxidative stress in rats. *Pakistan J. Nutr.*, 135-141.
- Vareed, S., Reedy, M., Schutzki, R., & Nair, M. (2006). Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. *Life Sciences*, 78, 777-784. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.094

- Venereo, G. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar*, 126-133.
- Wang, J., & Mazza, G. (2002). Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 850-857.
- Wen, Y., Chen, H., Zhou, X., Deng, Q., Zhao, Y., Zhaoabc, C., & Gongabc, X. (2015). Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, 19686-19695.
- Wong, P., Yusof, S., Ghazali, H., & Che Man, Y. (2002). Physicochemical characteristics of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition and Food Science, II*, 68-73.
- Zapata, L. M., Heredia, A. M., Quinteros, C. F., & Malleret, A. D. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia Docencia y Tecnologia*, 166-192.

ANEXOS

Anexo 1 Gráfica de determinación de la presencia de antocianinas



Anexo 2 Valores obtenidos de la extracción y cuantificación de antocianinas de Flor de Jamaica con distintos tratamientos mediante espectrofotometría UV-Vis.

DISOLVENTE ETANOL 96% CON ÁCIDO CLORHÍDRICO 37 % EN RELACIÓN 85:15							
Relación - tiempo	Tratamiento	Réplica	Absorbancia (520 nm)	Promedio	Concentración (mg/100g)	% Humedad	Sólidos totales
1:20 a 15 min	T ₁ M ₁	T ₁ M _{1,1}	0,2182	0,2159	7,069	99,23	0,77
		T ₁ M _{1,2}	0,2173		7,043	99,16	0,84
		T ₁ M _{1,3}	0,2123		7,012	99,21	0,79
1:25 a 15 min	T ₁ M ₂	T ₁ M _{2,1}	0,1750	0,1748	6,049	98,87	1,13
		T ₁ M _{2,2}	0,1747		6,034	99,06	0,94
		T ₁ M _{2,3}	0,1749		6,045	99,11	0,89
1:20 a 30 min	T ₂ M ₁	T ₂ M _{1,1}	0,1890	0,1855	6,537	99,23	0,77
		T ₂ M _{1,2}	0,1820		6,284	99,08	0,92
		T ₃ M _{1,3}	0,1854		6,376	99,15	0,85
1:25 a 30 min	T ₂ M ₂	T ₂ M _{2,1}	0,1435	0,1421	5,094	99,12	0,88
		T ₂ M _{2,2}	0,1417		4,921	99,20	0,80
		T ₂ M _{2,3}	0,1410		4,854	98,97	1,03
DISOLVENTE AGUA							
Relación - tiempo	Tratamiento	Réplica	Absorbancia (520 nm)	Promedio	Concentración (mg/100g)	% Humedad	Sólidos totales
1:20 a 15 min	T ₁ M ₁	T ₁ M _{1,1}	0,2082	0,2059	7,822	99,724	0,276
		T ₁ M _{1,2}	0,2073		7,789	99,728	0,272
		T ₁ M _{1,3}	0,2023		7,601	99,726	0,274
1:25 a 15 min	T ₁ M ₂	T ₁ M _{2,1}	0,2690	0,2654	8,085	99,729	0,271
		T ₁ M _{2,2}	0,2620		7,875	99,712	0,288
		T ₁ M _{2,3}	0,2654		7,977	99,747	0,253
1:20 a 30 min	T ₂ M ₁	T ₂ M _{1,1}	0,2120	0,2132	7,965	99,805	0,195
		T ₂ M _{1,2}	0,2137		8,029	99,812	0,188
		T ₃ M _{1,3}	0,2139		8,037	99,815	0,185
1:25 a 30 min	T ₂ M ₂	T ₂ M _{2,1}	0,2735	0,2720	8,521	99,828	0,172
		T ₂ M _{2,2}	0,2710		8,146	99,817	0,183
		T ₂ M _{2,3}	0,2717		8,167	99,835	0,165

Anexo 3 Análisis de Varianza para la determinación de la concentración de antocianinas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Relación MV-VD	0,194565	1	0,194565	13,66	0,0101
B:Tiempo extracción	0,245388	1	0,245388	17,23	0,0060
AB	0,000507	1	0,000507	0,04	0,8565
Blocks	0,0569572	2	0,0284786	2,00	0,2160
Total error	0,0854322	6	0,0142387		
Total (corr.)	0,58285	11			

R-cuadrada = 85,3423 porciento

Optimizar respuesta

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Relación MV-VD	20,0	25,0	25,0
Tiempo extracción	15,0	30,0	30,0

Anexo 4 Concentración de antocianinas de Flor de Jamaica antes y después de ser encapsuladas

Réplicas	Muestra líquida		Muestra en polvo	
	Abs (520nm)	Concentración (mg/100g)	Abs (520nm)	Concentración (mg/100g)
1	0,2735	8,521	0,2705	8,427
2	0,2710	8,146	0,2762	8,302
3	0,2717	8,167	0,2769	8,323

Anexo 5 Rendimiento del microencapsulado

Muestra	Peso maltodextrina (g)	Peso final de la muestra-polvo (g)	Rendimiento (%)
1	10	6,742	67,42

Anexo 6 Obtención del microencapsulado de antocianinas



Anexo 7 Determinación del contenido de antocianinas por análisis de pH diferencial

Réplicas	Muestra Buffer pH1		Muestra Buffer pH4,5		Concentración (mg/100 g)
	Abs (522 nm)	Abs (700 nm)	Abs (522 nm)	Abs (700 nm)	
1	0,5686	0,0292	0,0857	0,0793	8,908
2	0,5422	0,0289	0,0835	0,0698	8,350
3	0,5597	0,0304	0,0902	0,0744	8,583

Anexo 8 Análisis de varianza para antocianinas de Flor de Jamaica

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,076921	1	0,076921	0,7603	0,2131
Intra grupos	0,007920	2	0,004567		
Total (Corr.)	0,020833	3			

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Microencapsulado (Después)	3	8,351	X
Sin microencapsular (antes)	3	8,278	X

Anexo 9 Análisis de varianza para determinar el potencial antioxidante in vitro

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	17860,7616	2	17860,7616	480,07	0,0000
Intra grupos	26,3677333	6	13,1688667		
Total (Corr.)	17894,4685	8			

Anexo 10 Curva de calibración entre el % de inhibición vs. μmol equivalentes de Trolox

