



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



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**Extracción y microencapsulación de antocianinas con actividad antioxidante y
antiinflamatoria obtenidas a partir de fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Lizbeth Estefanía Moreno Villacís

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández.

Ambato-Ecuador

Enero - 2020

**APROBACIÓN DEL
TUTOR**

PhD. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA

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

Ambato, 26 de noviembre de 2019



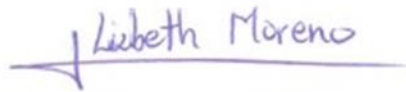
.....
PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I 175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Lizbeth Estefanía Moreno Villacís, manifiesto que os resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in purple ink that reads "Lizbeth Moreno". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal stroke.

.....
Srta. Lizbeth Estefanía Moreno Villacís


C.I. 180439506-7

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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

Para consistencia firman:



.....
Presidente del Tribunal



.....
PhD. Freddy David Escobar Terán

C.I. 1715290050



.....
Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

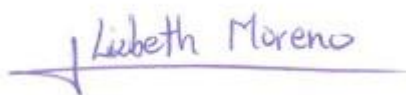
C.I. 175718120-9

Ambato, 06 de enero de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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



.....
Srta. Lizbeth Estefanía Moreno Villacís

C.I. 180439506-7

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios por permitirme alcanzar una meta más en mi vida.

A mi padre Claudio por el esfuerzo, cariño y apoyo incondicional que me ha demostrado.

A mi madre Virginia que siempre ha estado apoyándome en todo momento.

A la memoria de mi madre Eloísa y mi padre de crianza Arnaldo los recordaré por toda la vida.

A mis hermanos: Darwin, Claudio, Mayra y Lenin quienes me brindaron consejos y palabras de aliento e hicieron de mí una mejor persona.

A mis sobrinos loquillos que con cada sonrisa y ocurrencia me motivan a cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones que ha derramado sobre mí y mi familia, pues sin Él nada es posible.

A mis padres ya que el esfuerzo y las metas alcanzadas, refleja la dedicación, el amor que invierten sus padres en sus hijos.

A toda mi familia porque de una u otra manera siempre estuvieron pendiente de mí, pues sin duda alguna los momentos más felices de mi vida han sido a lado de mi familia, infinitas gracias por todo.

A la Universidad Técnica de Ambato a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por la formación académica durante toda mi carrera universitaria.

A mi querido Tutor PhD. Orestes López por la paciencia, el apoyo y los consejos que me ha brindado para la realización de este proyecto.

A todos mis amigos y amigas que durante toda nuestra etapa universitaria pasamos momentos únicos que los recordaré siempre y los llevaré presentes en mi mente y en mi corazón toda la vida.

ÍNDICE GENERAL

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
.....	III
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I	VIII
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 Descripción de la planta	1
1.1.1.1 Fréjol rojo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	1
1.1.2 Taxonomía.....	3
1.1.3 Compuestos fitoquímicos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L	4
1.1.4 Antocianinas	5
1.1.5 Actividad antioxidante de antocianinas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	7
1.1.6 Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	8
1.1.7 Microencapsulación.....	9
1.2 Hipótesis	10
1.2.1 Hipótesis nula	10
1.2.2 Hipótesis alternativa.....	10
1.3 Señalización de las variables de la hipótesis.....	10
1.3.1 Variables dependientes.....	10
1.3.2 Variables independientes	10
1.4 Objetivos	10
1.4.1 Objetivo General	10
1.4.2 Objetivos específicos	10
CAPÍTULO II	12
2.1 Materiales.....	12
2.1.1 Recursos materiales.....	12
2.1.2 Reactivos	12
2.1.3 Recursos Tecnológicos.....	12
2.2 Métodos	14
2.2.1 Obtención de harina de fréjol rojo.....	14
2.2.2 Caracterización físico-química del fréjol rojo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	14

2.2.2.1 Determinación del tamaño.....	14
2.2.2.2 Determinación del peso	14
2.2.2.3 Determinación del volumen.....	14
2.2.2.4 Determinación de la densidad.....	15
2.2.2.5 Determinación del color.....	15
2.2.2.6 Determinación de Potencial de Hidrógeno (pH).....	15
2.2.2.7 Determinación de sólidos solubles (°Brix).....	16
2.2.3 Obtención del extracto vegetal líquido	16
2.2.4 Determinación de sólidos totales del extracto.....	17
2.2.5 Microencapsulación mediante secado por aspersion	17
2.2.6 Análisis espectrofotométrico de los extractos.....	18
2.2.7 Determinación del potencial antioxidante del extracto <i>in vitro</i>	19
2.2.8 Análisis de la capacidad antioxidante <i>in vivo</i>	19
2.2.8.1 Crecimiento celular de levaduras.....	19
2.2.8.2 Evaluación de la capacidad antioxidante.....	20
2.2.9 Análisis de Espectrofotometría Infrarroja FT-IR.....	21
2.2.10 Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante el método de	21
estabilización de membrana de eritrocitos	21
2.2.10.1 Preparación de la solución de eritrocitos al 40 %	21
2.2.10.2 Cuantificación de la actividad antiinflamatoria mediante espectrofotometría	22
UV-Vis	22
2.3 Procesamiento y análisis de datos.....	23
2.3.1 Diseño Experimental.....	23
CAPÍTULO III.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1 Análisis y discusión de resultados	25
3.1.1 Caracterización fisicoquímica del fréjol rojo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)	25
3.1.1.1 Caracterización física del fréjol	25
3.1.1.2 Determinación del color.....	26
3.1.1.3 Determinación del Potencial de Hidrógeno (pH)	26
3.1.1.4 Determinación de sólidos solubles (°Brix).....	26
3.1.2 Obtención del extracto vegetal líquido	27

3.1.3 Microencapsulación mediante secado por aspersión	29
3.1.4 Análisis de Espectrofotometría Infrarroja FT-IR	31
3.1.5 Determinación del potencial antioxidante del extracto <i>in vitro</i>	33
3.1.6 Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vivo</i>	35
3.1.7 Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante el método de	37
estabilización de membrana de eritrocitos	37
3.2 Verificación de la Hipótesis.....	39
CAPÍTULO IV	40
4.1 CONCLUSIONES	40
4.2 RECOMENDACIONES.....	41
MATERIAL DE REFERENCIA	42
5.1 Referencia Bibliográfica	42
ANEXOS	50

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ECUACIONES	xi
RESUMEN EJECUTIVO	xii
ÍNDICE DE TABLAS	

Tabla 1.- Descripción morfológica de la planta de fréjol rojo	2
Tabla 2.- Composición química y nutricional del fréjol por cada 100 gramos	3
Tabla 3.- Taxonomía del fréjol	4
Tabla 4.- Estructura básica de las antocianinas más importantes	6
Tabla 5.- Estructura del diseño experimental	23
Tabla 6.- Distribución de tratamientos	24
Tabla 7.- Características físicas del fréjol rojo	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Planta, flor y granos de fréjol rojo	2
Figura 2.- Estructura de la antocianina glucosilada (Cianidina-3-glucósido)	5
Figura 3.- a. Efectos principales para concentración de antocianinas. b. Superficie de respuesta estimada	28
Figura 4.- Eficiencia de microencapsulación (%) de las matrices poliméricas	30
Figura 5.- Espectrofotometría Infrarroja FT-IR	32
Figura 6.- Actividad antioxidante in vitro de los microencapsulados.....	34
Figura 7.- Curvas de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la evaluación de la actividad antioxidante in vivo	35
Figura 8.- Comparación del porcentaje de actividad antiinflamatoria de los microencapsulados con el fármaco estándar de referencia	38

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Cálculo de la densidad	15
Ecuación 2 Determinación de sólidos totales	17
Ecuación 3 Porcentaje de Eficiencia de microencapsulación	18
Ecuación 4 Concentración de antocianinas	19
Ecuación 5 Porcentaje de inhibición de DPPH	19
Ecuación 6 Porcentaje de actividad antiinflamatoria	23

RESUMEN EJECUTIVO

En esta investigación se realizó la extracción y microencapsulación de antocianinas obtenidas a partir de fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L), para la extracción se utilizó una mezcla de disolventes a una relación 85:15 (etanol al 96 % y ácido clorhídrico al 37 %), relación materia vegetal / volumen de disolvente 1:25 con una temperatura constante de 70 ± 2 °C por 120 minutos. El extracto obtenido se microencapsuló mediante secado por aspersion utilizando dos matrices poliméricas (maltodextrina y goma arábica). El porcentaje de eficiencia de microencapsulación de la maltodextrina fue de 70,96 % y de la mezcla (maltodextrina-goma arábica 50:50) 92,52 %. Se evaluaron las propiedades antioxidantes de los extractos microencapsulados mediante la técnica *in vitro* DPPH e *in vivo* mediante el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a un estrés oxidativo por la adición de peróxido de hidrógeno en donde se pudo observar que los microencapsulados protegen a la levadura de agentes oxidantes, mostrando mayor actividad antioxidante que la vitamina C. De igual manera se determinó la actividad antiinflamatoria mediante la técnica de estabilización de membrana de eritrocitos en donde se obtuvo 90,55 % a una concentración de 1,5 mg/ml para el microencapsulado con maltodextrina y 93,70 % a una concentración 2,5 mg/ml para la mezcla, estos valores son superiores al ser comparados con el fármaco utilizado como control (ácido acetil salicílico).

Palabras claves: Microesferas, extracto, *Phaseolus vulgaris*, secado por aspersion.

ABSTRACT

In this investigation the extraction and microencapsulation of anthocyanins obtained from red beans (*Phaseolus vulgaris* L.) was carried out, for the extraction a mixture of solvents was used at a ratio of 85:15 (96 % ethanol and 37 % hydrochloric acid), ratio of plant matter / solvent volume 1:25 with a constant temperature of 70 ± 2 ° C for 120 minutes. The extract obtained was microencapsulated by spray drying using two polymeric matrices (maltodextrin and gum arabic). The percentage of microencapsulation efficiency of maltodextrin was 70,96 % and of the mixture (maltodextrin-gum arabic 50:50) 92,52 %. The antioxidant properties of the microencapsulated extracts were evaluated by means of the in vitro DPPH technique and in vivo by the growth of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast exposed to oxidative stress by the addition of hydrogen peroxide where it was observed that the microencapsulates protect the yeast of oxidative agents; The results of the microencapsules had greater antioxidant activity than vitamin C. Similarly, the antiinflammatory activity was determined by the erythrocyte membrane stabilization technique where 90,55 % was obtained at a concentration of 1,5 mg / ml for Maltodextrin and 93,70 % at a concentration of 2,5 mg / ml for the mixture, these values are higher when compared to the commercial drug acetylsalicylic acid (aspirin)

Keywords: Microspheres, extract, *Phaseolus vulgaris*, spray drying.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Descripción de la planta

1.1.1.1 Fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L)

El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L) pertenece a las plantas dicotiledóneas, de orden Fabales y Familia Fabaceae, tiene diferentes centros de origen en lo que se pueden destacar Mesoamérica y América del Sur Andina, que durante aproximadamente unos 500 años se han ido domesticando en cada región, es el tercer acervo genético de gran importancia existente en el Ecuador y en el norte de Perú. (García-Fraile et al., 2010).

Se desarrolla en climas cálidos y templados, es sensible a la humedad ambiental, se ve afectado por cambios bruscos de temperatura, tiene una particularidad en cuanto al suelo no es exigente, pero es susceptible a enfermedades limitándole de tal manera a la productividad en ambientes trópicos, el umbral térmico de la especie es de 10 °C como temperatura mínima y 25 °C como temperatura máxima (Torres et al., 2014). En el Ecuador se cultiva en mayor proporción en los valles de las provincias de Carchi, Imbabura y Loja; de igual manera en la cordillera de las provincias de Chimborazo y Bolívar. (Yanez, 2017).

El fréjol tiene un alto potencial nutricional como: proteínas, vitaminas, hierro, fósforo; aporta también fibra, ácido fólico, tiamina y compuestos bioactivos que ayudan a la prevención de enfermedades catastróficas como el cáncer. (Beaver, Kelly, & Myers, 2010). Es considerado un componente básico e importante en la alimentación humana pues puede sustituir las proteínas de origen animal especialmente la carne, además al ser leguminosa mejora los suelos por su poder nitrificante. Posee un alto contenido de compuestos antioxidantes y antiinflamatorios como las antocianinas que ayudan a combatir enfermedades inmunológicas. En la **Tabla 1** se detalla la descripción morfológica del fréjol rojo establecida por investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador codificada con INIAP 484 Centenario, proveniente de la cruce entre líneas AMPR5 de grano rojo moteado realizado en el año 2006. (Peralta, Mazón, Rodríguez, & Murillo, 2014)

Tabla 1.- Descripción morfológica de la planta de fréjol rojo

Altura de la planta:	45 a 50 cm
Color de la flor:	rosa pálido
Color del grano:	rojo moteado/ crema
Forma del grano:	arriñonado
Peso de 100 granos:	55 a 58 g
Peso hectolítrico:	75 (kg/hl)
Tamaño del grano:	grande
Días de floración:	42 a 45
Días a la cosecha en tierno:	75 a 95
Días a la cosecha en seco:	90 a 110
Adaptación:	1400 a 2400 m

Fuente: Peralta, Mazón, Rodríguez, & Murillo, 2014



Figura 1.- Planta, flor y granos de fréjol rojo

Fuente: INIAP, 2014

La **Tabla 2** representa la información química y nutricional del fréjol entre los que se puede destacar: la cantidad de carbohidratos con un 69,1 % seguido de la cantidad de proteína con un 25,40 % y fibra con 17,4 % por cada 100 gramos de fréjol analizado (Suárez-Martínez et al., 2016).

Tabla 2.- Composición química y nutricional del fréjol por cada 100 gramos

Energía	337 kcal
Agua	12,10 %
Proteínas	25,40 %
Grasa	1,70 %
Carbohidratos	69,11 %
Fibra	17,4 %
Cenizas	3,78 %
Azúcar	4,41 %
Calcio	167 mg
Fósforo	463 mg
Hierro	6,24 mg
Tiamina	0,88 mg
Riboflavina	0,18 mg
Niacina	2,48 mg

Fuente: Suárez- Martínez et al., 2016

1.1.2 Taxonomía

Según (Valladares, & Ceiba, 2010); (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008) la taxonomía del fréjol se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 3.- Taxonomía del fréjol

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Orden:	Fabales
Superorden:	Rosanae
Familia:	Fabaceae
Género:	<i>Phaseolus</i> L
Especie:	<i>vulgaris</i>
Nombre binomial:	<i>Phaseolus vulgaris</i> L
Nombres comunes:	Fréjol, fríjol, poroto, habichuela, judía, ejote

Fuente: www.tropicos.org; Valladares & (2010); de la Torre et al. (2008).

1.1.3 Compuestos fitoquímicos de *Phaseolus vulgaris* L.

Las sustancias fitoquímicas son compuestos producidos por las plantas, se encuentran principalmente en frutas, verduras, granos, fréjoles y en otras plantas, existen más de 2000 fitoquímicos en las plantas; se clasifican de acuerdo a su función y características estructurales, lo más estudiados son los terpenos, fenoles y los tioles. (Guillamon, 2018). El objetivo principal de las sustancias fitoquímicas es proteger a las células del daño que podría terminar en enfermedades crónicas como el cáncer. Algunas de las sustancias fitoquímicas benéficas son: los carotenoides, polifenoles y las antocianinas exclusivamente de alimentos que poseen pigmentación roja, morada, negra entre otros. (Rodríguez & Fernández, 2004). El fréjol tiene compuestos fitoquímicos como proteínas, carbohidratos, fibra, minerales, vitaminas como timina, riboflavina, niacina y compuestos bioactivos como los fenoles que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales según estudios realizados por (Ramírez-Pérez, DíazRuiz, Jacinto-Hernández, Paredes-Sánchez, & Garza García, 2018), también establece que la pigmentación roja del fréjol es reflejada por la presencia y concentración de antocianinas, flavonoides y taninos condensados. Mediante análisis de HPLC-

DADMS3 se ha determinado que el fréjol rojo posee el mayor contenido de antocianinas que pertenece al tipo cianidina específicamente cianidina-3-glucósido (Ver figura 2) (Bouvier, Stragier, Morales, Re, & Gutierrez, 2008). El contenido nutracéutico del fréjol es influenciado por varios factores como: el desarrollo de la planta, factores ambientales y condiciones de almacenamiento; es considerado uno de los más completos a nivel de plantas por poseer un alto contenido de proteínas, carbohidratos y fibra que ayuda considerablemente en la dieta alimenticia

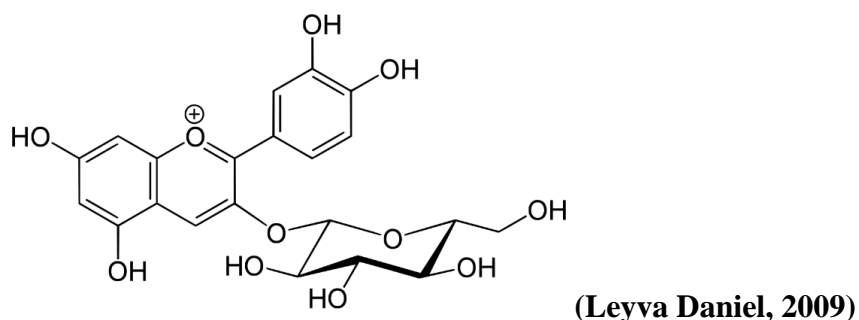


Figura 2.- Estructura de la antocianina glucosilada (Cianidina-3-glucósido)

Fuente: Leyva Daniel, 2009

1.1.4 Antocianinas

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas (aglicona) pertenecientes a la familia de los flavonoides considerado como un grupo de pigmentos hidrosolubles vacuolares distribuidos ampliamente en el reino vegetal. En su estructura tiene dos anillos aromáticos A (benzopirilio) y B (anillo fenólico) unidos por una cadena de 3 carbonos, de la variación estructural del anillo B resultan seis antocianinas que se conoce como las más importantes (pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, malvidina), la combinación de las antocianinas antes mencionadas con diferentes azúcares se realiza mediante un enlace β -glucósido que genera aproximadamente 150 antocianinas. (Ortíz et al., 2011)

La aglicona o también denominada flavilio o 2-fenilbenzopirilio es la estructura más importante de las antocianinas debido a que contiene dos enlaces conjugados que se encarga de la absorción de la luz a una determinada longitud de onda permitiendo de tal manera observar los colores característicos de las antocianinas. (Ferreira, Stringheta, &

Cano, 2007). Las antocianinas pueden ser penta-sustituidas (3,5,7,3',4') o hexasustituidas (3,5,7,3',4', 5') difieren en el número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B del catión flavilio, en la **Tabla 4** se puede observar las diferentes estructuras de las antocininas más importantes que tienen características menos solubles y estables en agua. **(Rein, 2005)**

Tabla 4.- Estructura básica de las antocianinas más importantes

Antocianina	Estructura básica	R ₁	R ₂	R ₃	Color principal	Fuentes
Cianidina		-OH	-OH	-H	Naranja-rojizo	Manzana, saúco, nectarino, mora, ciruela, melocotón, frijoles
Delfinidina		-OH	-OH	-OH	Púrpura, azul	Uvas, berenjena
Pelargonidina		-H	-OH	-H	Naranja	Rábanos, frijoles
Malvidina		-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	Púrpura	Uvas
Peonidina		-OCH ₃	-OH	-H	Rojo-púrpura	Arándanos, ciruelas, uvas, maíz morado
Petunidina		-OH	-OH	-OCH ₃	Rojo-oscuro o púrpura	Uvas, vayas rojas

Fuente: Rein, 2005

La expresión de color de las antocianinas en diferentes partes de la planta (tallo, hojas, flores y fruto) se ve influenciada por factores como los sustituyentes químicos que contiene la molécula, de igual manera la posición y orientación de estos en el grupo flavilio; por tanto, si en el anillo fenólico se aumentan grupo hidroxilo el color azul se intensifica y si se introducen grupos metoxilos genera coloraciones rojas. Existen diferentes factores que afectan la coloración y estabilidad de las antocianinas como por ejemplo la temperatura (incrementos bruscos- pérdida del azúcar glicosilante y producción de sustancias incoloras) luz, pH (la acidez- efecto protector sobre la molécula), presencia de copigmentos, iones metálicos etc. **(Garzón, 2008).**

Según estudios realizados por **(Kechinski, Guimarães, Noreña, Tessaro, & Marczak, 2010)** establecen que para la extracción de antocianinas es aconsejable la utilización de muestras secas, liofilizadas o congeladas para mejorar un rendimiento de extracción ya que comúnmente se realizan extracciones sólido-líquido cuando se utiliza material vegetal seco, además se usan disolventes; es evidente que la característica polar que tiene la molécula de las antocianinas permite aprovechar una gran variedad de disolventes como

por ejemplo alcoholes, acetona. Agua o una mezcla de los disolventes antes mencionados a diferentes relaciones, además se puede incorporar una pequeña cantidad de ácido (15 % HCl) con el objetivo de conseguir la forma del catión flavilio, debido a que es estable en un medio altamente ácido.

1.1.5 Actividad antioxidante de antocianinas *in vitro* e *in vivo*

Mediante diversas investigaciones se ha determinado que los frutos verduras y plantas ricas en antocianinas tienen una alta actividad antioxidante contra los siguientes compuestos: peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales: peróxido (ROO), superperóxido (O_2), hidroxilo (-OH), permitiendo la captura de los radicales y evitando un daño oxidativo celular ya que es el principal causante de enfermedades catastróficas como diabetes y los diferentes tipos de cáncer. En los ensayos de la capacidad antioxidante de diferentes antocianinas se ha podido evidenciar que posee hasta 3,5 veces mayor poder antioxidante que el Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) análogo de la vitamina E. **(Burgos et al., 2016).**

Actualmente existen diversas metodologías para la determinación de la actividad antioxidante que tiene como objetivo captar los radicales libres ya sea por técnicas *in vitro* o *in vivo*. Para la metodología *in vitro* se puede mencionar el uso de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) que son los más recomendados por varios investigadores. (R. Figueroa, Tamayo, González, & Moreno, 2011).

El método DPPH es el más utilizado debido a que la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidracilo es un radical libre y estable, que cuando se mezcla con una solución de sustrato que pueda donar un átomo de hidrógeno se forma una molécula reducida de DPPH permitiendo de tal manera la pérdida del color violeta original, para determinar el poder antioxidante de los sustratos se lo realiza mediante el cambio de la densidad óptica de los radicales de DPPH a una longitud de onda de 517 nm **(Guija, Camones, Ponce, & Zarzosa, 2015).**

Es de gran importancia recalcar que ciertos compuestos bioactivos pueden tener mayor poder antioxidante mediante técnicas *in vitro* que *in vivo* por ello es recomendable la realización de los dos estudios ya que el DPPH es un radical ajeno al organismo y puede

variar los resultados en cada experimento debido al efecto antioxidante y prooxidante. **(Mera, 2018).**

Para la determinación de la actividad antioxidante mediante técnicas *in vivo* se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, considerada como modelo para estudios de biología molecular, celular y ensayos de determinación de antioxidantes naturales provenientes de fuentes vegetales. La levadura *S. cerevisiae* tiene varias características por lo cual se le ha considerado como modelo entre las que se puede destacar su fácil manejo, rápido crecimiento, su libre acceso y bajo costo. El peróxido de hidrógeno es utilizado como modelo promotor de estrés oxidativo, este compuesto se forma durante la respiración aeróbica y es usado conjuntamente con la levadura en el cual genera daños por estrés oxidativo, siendo una molécula de señalización en procesos biológicos. **(Veal, Day, & Morgan, 2007).**

Los organismos aeróbicos tiene diferentes mecanismos para la neutralización de radicales libres generados en el metabolismo, las células tienen complejos enzimáticos (superóxido, dismutasas y catalasas) y no enzimáticos (glutatión) que ayudan a prevenir el daño oxidativo **(Peláez, 2016)**, de tal manera evita la generación de sustancias perjudiciales para la salud.

1.1.6 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

La inflamación es una respuesta protectora a la lesión tisular e implica la liberación del mediador a la activación enzimática, migración celular, descomposición y reparación de tejidos, están generalmente dirigidos a la defensa del huésped y es activada en la mayoría de las enfermedades. **(Kumar, Bhat, Kumar, Bohra, & Sheela, 2011).**

Estudios realizados por varios investigadores establecen que los efectos antiinflamatorios de las antocianinas de tipo cianidina actúan en la inhibición de las enzimas COX (ciclooxigenasa) y LOX (lipoxigenasa); enzimas que permiten la reacción defensiva del tejido frente a diferentes estímulos nocivos. En la actualidad se ha estudiado al diclofenaco sódico como un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) estándar de referencia para la prueba de actividad antiinflamatoria *in vitro* de la membrana de glóbulos rojos humanos

(HRBC) por medio de un método de estabilización dando resultados favorables en análisis de diferentes antocianinas y estableciendo propiedades anticarcinogénicas. **(Vareed, Reddy, Schutzki, & Nair, 2006)**

1.1.7 Microencapsulación

Los micronutrientes son inestables en la naturaleza y pueden degradarse con facilidad bajo condiciones ambientales efecto de pH, humedad relativa y temperatura es por ello que han implementado procesos como la encapsulación permitiendo atrapar los componentes sensibles en una matriz ya sea homogénea o heterogénea para su protección, en la actualidad se han implementado diversos compuestos bioactivos como: aminoácidos, vitaminas, enzimas, minerales, edulcorantes, colorantes, antioxidantes e incluso microorganismos probióticos útiles para la industria alimentaria, textil y farmacéutica. **(Desai & Park, 2005)**.

El proceso de microencapsulación se ve reflejado en la creación de micropartículas con diámetros entre micrómetros y milímetros con características de películas delgadas o membranas semipermeables mediante la utilización de matrices poliméricas (almidones, jarbes de maíz, maltodextrina, goma arábiga carboximetilcelulosa) creando una barrera física entre los diversos compuestos **(García, Ceja, 2012)**. Las matrices poliméricas más usadas por su alto poder de rendimiento son la Maltodextrina y la Goma arábiga, en algunos procesos se utiliza también el alginato el cual es apto para atrapar microorganismos probióticos. Existen diversos métodos de microencapsulación y se dividen en dos grandes grupos: químicos (coacervación y gelificación iónica) y mecánicos (secado por aspersión, liofilización, por congelación o enfriamiento, emulsión, recubrimiento en lecho fluidizado). Las formas y tamaños de las partículas dependen del método y el material ya sea monómeros o polímeros. El método más utilizado para la microencapsulación de compuestos bioactivos como las antocianinas es secado por aspersión, también conocido como Spray Drying. **(Nizori, Bui, & Small, 2012)**. El método Spray Drying es una operación unitaria que tiene como principio convertir soluciones o dispersiones líquidas en polvo **(Shishir & Chen, 2017)**, es una de las técnicas más utilizadas por su bajo costo,

amplia disponibilidad del equipo; además de proporcionar una alta calidad de microcápsulas con un excelente rendimiento.

1.2 Hipótesis

1.2.1 Hipótesis nula

Las antocianinas microencapsuladas del fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L) no presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

1.2.2 Hipótesis alternativa

Las antocianinas microencapsuladas del fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L) presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

1.3 Señalización de las variables de la hipótesis

1.3.1 Variables dependientes

Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del extracto

1.3.2 Variables independientes

Matrices poliméricas microencapsulantes, relación material vegetal/ volumen de disolvente y tiempo de extracción.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Extraer y microencapsular antocianinas de fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L).

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas de extracción de antocianinas presentes en los granos de fréjol rojo.
- Microencapsular las antocianinas extraídas mediante el proceso de secado por aspersión con dos matrices poliméricas (maltodextrina y goma arábica).

- Evaluar la actividad antioxidante mediante técnicas *in vitro* e *in vivo* de las antocianinas microencapsuladas.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de las antocianinas microencapsuladas por el método de estabilización de membrana de eritrocitos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Recursos materiales

- Granos de fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L)
- Material de vidrio: balones de aforo, matraces, Erlenmeyer, pipetas, probetas graduadas, vasos de precipitación, varillas de agitación de marca Pyrex® y GLASSCO
- Frascos ámbar
- Micropipetas regulables de 5,20, 200 y 1000 microlitros
- Magnetos Elicrom
- Papel aluminio
- Material de escritorio: computadora, esferos, papel bond, cuaderno

2.1.2 Reactivos

- Etanol al 96 % de pureza Scharlan
- Ácido clorhídrico al 37 % Fisher
- Maltodextrina Roig Pharma
- DPPH (2.2-difenil-1-picrilhidracilo)
- Anticoagulante EDTA
- Ácido salicílico
- Ácido ascórbico
- Solución tampón fosfato (PBS) pH 7,4

2.1.3 Recursos Tecnológicos

- Balanza analítica Ohauspioneer
- Balanza de humedad Kern MLS 50-3
- Destilador de agua QUIMIS
- Plancha de calentamiento ThermoScientific
- Refrigerador Indura

- Molino de cuchillas INOX-EQUIP
- Horno secador GANDER MTN
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen, Germany)
- Espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go
- Espectrofotómetro infrarrojo Jasco FT/IR 4100
- Calibrador Pie de rey BP GOLD
- Colorímetro Lovbond LC 100
- pH-metro digital marca ORIOM 420^a
- Computador Dell Inspiron 15R con sistema operativo Windows 10
- Mini Spray Dryer BUCHI-B290
- Rotoevaporador IKA HB10
- Software de análisis de datos estadístico y gráfico, Statgraphics XVII 64x

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de harina de fréjol rojo

Los granos de fréjol se consiguieron en el Mercado Mayorista ubicado en la ciudad de Ambato perteneciente a la provincia de Tungurahua, la materia prima fue trasladada a la Universidad Técnica de Ambato a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Los tratamientos requeridos para la materia prima se realizaron en los Laboratorios de la Unidad Operativa de Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE). Se lavaron los granos de fréjol y se colocó en el horno secador (Gander MTN) el proceso de secado se realizó durante 24 horas a una temperatura de 60 °C.

Luego del proceso de secado el material obtenido se sometió a un proceso de molienda en un molino de cuchillas con el fin de obtener un polvo fino para la realización de pruebas posteriores.

2.2.2 Caracterización físico-química del fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L)

2.2.2.1 Determinación del tamaño

Con un Calibrador Pie de rey (BP GOLD) se determinó el tamaño del fréjol (longitud y diámetro), se tomó el registro en unidades de centímetros a 10 muestras aleatorias diferentes.

2.2.2.2 Determinación del peso

Con una balanza analítica (marca Ohauspioneer) con una precisión de calibrado de 0,1g, se registró el peso de diez unidades de fréjol, posterior a la lectura de los pesos se realizó un valor promedio de las réplicas.

2.2.2.3 Determinación del volumen

El principio de Arquímedes establece que “El volumen del líquido desplazado por un cuerpo al sumergirse es igual al volumen de la parte sumergida del cuerpo” es decir el cuerpo sumergido total o parcialmente ejerce una fuerza ascendente igual al empuje del

peso del líquido que se desplaza (**Espinosa; Sánchez, 2014**). Según lo mencionado por Arquímedes para la determinación del volumen del fréjol se utilizó un vaso de precipitación de 25 ml, se colocó en un recipiente en el que se recogió el agua desplazada, se introdujo el fréjol, con la ayuda de una probeta se midió el líquido desplazado (la cantidad de agua medida es igual al volumen del fréjol) este ensayo se repitió por diez veces y se realizó un valor promedio de las réplicas.

2.2.2.4 Determinación de la densidad

Con los datos obtenidos de peso y volumen de fréjol se realizó el cálculo de la densidad mediante la **Ecuación 1**:

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Ecuación 1 Cálculo de la densidad

Donde: (ρ) es el símbolo de densidad, (m) es la masa en gramos y (v) el volumen en mililitros

2.2.2.5 Determinación del color

Con un colorímetro marca Lovinond LC 100 previamente calibrado se midió en 3 puntos diferentes de la muestra de fréjol para la determinación del color. Se utilizó la escala de CIE Lab, en el cual está establecido por tres coordenadas colorimétricas adimensionales (**L*a*b**) en donde **L** representa la luminosidad, **a** componente verde-rojo y **b** componente amarillo-azul (**Teja, Science, & Ah-hen, 2014**) este ensayo tiene similitud visual humana y se realizó por diez veces.

2.2.2.6 Determinación de Potencial de Hidrógeno (pH)

Para la determinación del potencial de hidrógeno se utilizó un pH-metro digital marca ORION 420 A, se realizó la metodología descrita por el Instituto Ecuatoriano de

Normalización (NTE INEC-ISO 1842, 2013), se midió directamente en una solución de 45 ml de agua destilada con 5 g de muestra de fréjol con un previo tratamiento.

2.2.2.7 Determinación de sólidos solubles (°Brix)

Se utilizó un refractómetro digital (ATACO Pocket-Japón), se realizó la metodología descrita en la norma NTE INEN-ISO 2173 para la determinación de sólidos solubles de frutas y vegetales mediante el método refractométrico (INEN-ISO-2173, 2013).

2.2.3 Obtención del extracto vegetal líquido

Posterior a la obtención de la harina de fréjol rojo se realizó la extracción de compuestos bioactivos (antocianinas), en la extracción se tomaron en cuenta dos factores: relación materia vegetal/ volumen de disolvente (1:20 y 1:25) y tiempo de extracción de 60 y 120 minutos, los análisis se realizaron con tres réplicas cada uno. Para la preparación del disolvente se utilizó etanol al 96 % de pureza y ácido clorhídrico a 37 % en una relación 85:15.

En la preparación de la relación de materia vegetal/ volumen de disolvente (1:20) se pesaron 2 g de muestra en una balanza analítica (OhausPioneer) y se midió 50 ml de disolvente; para la relación 1:25 se pesó 2,5 g de la muestra y 50 ml de disolvente. Los ensayos se realizaron por triplicado, se colocaron en matraces Erlenmeyer marca Pyrex® cubiertos con papel aluminio para evitar la evaporación del disolvente, posterior a ello se colocaron los matraces Erlenmeyer en una plancha de calentamiento (ThermoScientific) durante 60 y 120 minutos respectivamente a una temperatura constante de 70 °C.

Al finalizar el proceso de extracción se centrifugó las muestras a 3000 min⁻¹ durante un tiempo de 10 minutos, luego de la obtención de las muestras centrifugadas se colocó el sobrenadante en frascos ámbar para evitar la reacción de las antocianinas con la luz, y el precipitado se desechó.

Una vez determinada la mejor relación de extracción y tiempo se procedió a realizar la extracción a mayor escala, posterior a ello se concentró el extracto en el rotoevaporador

(IKA HB10) a una temperatura de 72 °C y una velocidad de agitación de 150 min⁻¹, con una circulación constante de agua conectado al vacío permitiendo la destilación del disolvente. Al finalizar el proceso de concentración, se midió el volumen obtenido y se almacenó en un frasco de vidrio ámbar a una temperatura de 4 °C con el objetivo de evitar la degradación por acción de la luz y la temperatura.

2.2.4 Determinación de sólidos totales del extracto

En la determinación de la humedad residual de cada extracto se utilizó una balanza de humedad marca Kern MLS 50-3, todos los extractos se analizaron por triplicado. El valor de porcentaje de sólidos totales extraídos (% SST) se calculó mediante la siguiente Ecuación:

$$\% SST = 100 - \% humedad$$

Ecuación 2 Determinación de sólidos totales

2.2.5 Microencapsulación mediante secado por aspersión

Se preparó una dispersión para el proceso de secado previamente tomando en cuenta el contenido de sólidos totales por el análisis en la balanza de humedad, con esos datos se procedió a calcular la cantidad necesaria de concentrado, y de las matrices poliméricas (maltodextrina y goma arábica) y agua destilada, se mezcló con una agitación constante a una temperatura a 45 °C hasta que se mezclaron por completo la matriz polimérica en el agua y el concentrado. Finalmente se utilizó el equipo Mini Spray Dryer BUCHI-B290 en el cual se introdujo la mezcla, se verificó la presión del equipo -50 mbar y la temperatura de entrada sea de 150 °C y la de salida 90 °C para ello se controló el flujo de aire y agua; cuando los parámetros mencionados anteriormente se encontraron correctamente establecidos se realizó el proceso de secado, una vez finalizado el proceso se dejó pasar agua hasta que llegue a una temperatura de 100 °C, se cerraron los flujos de agua y aire para una recuperación de las antocianinas microencapsuladas.

Se determinó la eficiencia de microencapsulación del extracto en las diferentes matrices poliméricas (maltodextrina y la mezcla de maltodextrina -goma arábiga) se pesó 1,5 g de microencapsulado en 15 ml de agua destilada, se agitó durante 10 minutos, posteriormente se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro, este procedimiento se repitió con etanol al 70 %. Se utilizó la siguiente ecuación para la eficiencia de microencapsulación:

$$\% EE = \frac{[H_2O] - [EtOH]}{[H_2O]} * 100$$

Ecuación 3 Porcentaje de Eficiencia de microencapsulación

Donde:

% E. E= Eficiencia de microencapsulación, porcentaje en masa (%)

[H₂O] =Concentración total presente en las microcápsulas (mg/L)

[EtOH]= Concentración superficial presente en las microcápsulas (mg/L)

2.2.6 Análisis espectrofotométrico de los extractos

La determinación de absorbancia de cada extracto (A) se utilizó un espectrofotómetro UVVIS Fisher Scientific accu SkanGo a una longitud de onda de 535 nm para lo cual se utilizó etanol como blanco. La longitud de onda a utilizar dependió de la muestra analizada debido a que corresponde al punto donde la absorbancia del analito se maximiza para ello se analizó la longitud de onda mediante un barrido espectral, se utilizó un rango de 300 a 800 nm el cual permitió visualizar la variación de la absorbancia con la longitud de onda de radiación electromagnética, la elección de la longitud de onda óptima permitió cuantificar de una manera más eficiente el contenido de antocianinas del extracto.

Para la cuantificación de antocianinas se usó el modelo de con la siguiente Ecuación.

$$C = \frac{A}{\epsilon} \times \frac{Vol}{1000} \times MW \times \frac{1}{samplewt} \times 10^6$$

Ecuación 4 Concentración de antocianinas

Donde: (C) es la concentración de antocianinas expresadas en mg/100 g, (A) es la absorbancia, (ϵ) es la absorptividad molar del compuesto cianidina 3 glucósido 25740 (Gusti, Rodríguez, & Wrolstad, 1999), (Vol) el volumen total del extracto de antocianinas, (MW) el peso molecular de cianidina 3 glucósido 449 g/mol.

2.2.7 Determinación del potencial antioxidante del extracto *in vitro*

La cuantificación de la actividad antioxidante del extracto se tomó en cuenta lo descrito por Bobo-García et al., 2015, en esta técnica se utilizó DPPH (2,2 difenil-1picrilhidracilo), que posee un electrón desapareado que reacciona con el compuesto oxidante. (Bobo-García et al., 2015)

Para realizar la curva de calibración se utilizó como estándar una solución madre de Trolox de 50-500 $\mu mol L^{-1}$; el porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó mediante la siguiente Ecuación:

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

Ecuación 5 Porcentaje de inhibición de DPPH

Donde (A_m) es la absorbancia de la muestra, (A_b) la absorbancia del blanco reactivo y (A_c) la absorbancia del control.

2.2.8 Análisis de la capacidad antioxidante *in vivo*

2.2.8.1 Crecimiento celular de levaduras

Se utilizó cepas de *Sacharomyces cerevisiae* para la evaluación de la actividad antioxidante cultivadas con anterioridad en 200 ml de medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) con las siguientes características 2 g de levadura, 4 g de glucosa y peptona, incubadas a 28 °C con agitación constante durante 18 horas. Para generar colonias aisladas de levaduras se inoculó en medio YPD solidificado (YPD más agar) y finalmente se incubó a 28 °C durante 72 horas, se obtuvo estas cepas para el estudio de la actividad antioxidante.

2.2.8.2 Evaluación de la capacidad antioxidante

Se inoculó una sola colonia de *Saccharomyces cerevisiae* aislada previamente en 5 ml de medio líquido durante 6 horas con una agitación constante de 40 revoluciones por minuto a 28 °C.

Se llevó a cabo una dilución 1/10 del cultivo, se inoculó 5 μ L en 3 ml de medio líquido YPD, se agregó 1 ml del extracto a dos concentraciones: 25 mg/ml (0,5 g de microencapsulado en 20 ml de agua destilada) y 50 mg/ml (1 g de microencapsulado en 20 ml de agua destilada) se llevó a agitación constante de 100 min^{-1} por 18 horas con una temperatura de 28 °C. Para los controles se sustituyeron los microencapsulados por Vitamina C a las concentraciones antes descritas; para el control negativo se inoculó solo la levadura en el medio líquido YPD.

Se centrifugó a 2700 min^{-1} durante 10 minutos a una temperatura de 20 °C, las células precipitadas fueron resuspendidas en tampón fosfato (PBS pH 7,4) y finalmente se determinó la absorbancia a 600 nm hasta alcanzar una concentración de 0,1 en cada uno de los tratamientos.

Para la inducción del estrés oxidativo se usó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a diferentes concentraciones (0,5 y 3 mol/l) se añadió 1 ml de esta solución en cada uno de los tubos que contenía las concentraciones de microencapsulado y antioxidante (25 mg/ml y 50 mg/ml), posterior a ello se incubó durante 1 hora a 28 °C y se centrifugó a 2700 min^{-1} durante 20 minutos a una temperatura a 20 °C. El precipitado de células fueron resuspendidas en 1 ml de medio YPD fresco para la evaluación del crecimiento de la levadura.

Se colocaron 200 μ L de cada tratamiento de cultivo de levaduras, antioxidante y microencapsulado en una placa microtituladora de 96 pocillos para la determinación de la capacidad antioxidante, los ensayos se realizaron por triplicado y se controló el crecimiento durante 24 horas con una agitación continua a 30 °C, se determinó la

absorbancia a 600 nm cada 20 minutos en el espectrofotómetro (Ficher Scientific accu SkanGo)

2.2.9 Análisis de Espectrofotometría Infrarroja FT-IR

El análisis de espectrofotometría infrarroja se llevó a cabo en la Escuela Politécnica de Chimborazo en la Facultad de Ciencias en el Laboratorio de Química Instrumental mediante la utilización del espectroscopio infrarrojo Jasco FT/IR 4100 en el que se analizaron los microencapsulado del concentrado con las diferentes matrices, el extracto concentrado de antocianinas y las matrices poliméricas.

2.2.10 Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante el método de estabilización de membrana de eritrocitos

2.2.10.1 Preparación de la solución de eritrocitos al 40 %

Para la preparación de la solución de eritrocitos al 40 % se utilizó la metodología Kumar et al, 2011, realizando ciertas modificaciones. El proceso constó de varios pasos muy importantes como: extraer 5 ml de sangre humada de personas sanas que no hayan ingerido medicamentos antiinflamatorios en un periodo de 2 semanas antes de la realización del experimento, las muestras fueron colocadas en tubos al vacío heparinizados y con anticoagulante EDTA, seguidamente sin dejar mucho tiempo la muestra en los tubos se llevó a la centrífuga (HettichZentrifugen, Germany) durante 5 minutos a 3000 min^{-1} , se obtuvo la separación de fases: el sobrenadante (plasma sanguíneo) se retiró con una micropipeta y el precipitado (eritrocitos) se añadió 3 ml de solución tampón fosfato (PBS) pH 7,4; esta mezcla se llevó a la centrífuga durante 5 minutos a 3000 min^{-1} , este procedimiento se repitió 4 veces más, luego de los lavados se preparó la solución de eritrocitos al 40 % en PBS con un pH 7,4. (Kumar et al., 2011)

2.2.10.2 Cuantificación de la actividad antiinflamatoria mediante espectrofotometría UV-Vis

Para la cuantificación de la actividad antiinflamatoria del microencapsulado se aplicó la metodología impartida por **Rashid, 2011** con algunas modificaciones. En la preparación de la solución madre se utilizó extracto seco y tampón fosfato con un pH de 7,4 y se obtuvo una concentración final de 40 mg/ml, partiendo de esta solución madre se prepararon diferentes soluciones (3 ml de solución de microencapsulado en tampón fosfato) con concentraciones de 1; 1,5; 2; y 2,5 mg/ml. En la preparación de la solución patrón a una concentración de 40 mg/ml se utilizó aspirina (Bayer) de 500 mg a partir de esta concentración se realizaron soluciones estándar de concentración 1; 1,5; 2; y 2,5 mg/ml. Todos los ensayos se llevaron a cabo en 3 tubos de centrífuga de 25 ml con las siguientes etiquetas: Abs₁, Abs₂, Abs₃ cada una de ellas fueron condiciones diferentes que se detallan a continuación:

Abs₁: Se añadió 3 ml del extracto con 30 μ L de la solución de glóbulos rojos al 40 % previamente preparado y se mezcló ligeramente todo el contenido, posterior a ello se dejó reposar durante 20 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 3000 min^{-1} .

Abs₂: Se añadió 3 ml del extracto con 30 μ L de la solución de glóbulos rojos al 40 % y se mezcló ligeramente el contenido, posteriormente se sometió a baño María a una temperatura de 54 °C durante 20 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 3000 min^{-1} .

Abs₃: Se añadió 3 ml de tampón fosfato (PBS) pH 7,4 con 30 μ L de la solución de glóbulos rojos al 40 % y se mezcló ligeramente el contenido, posteriormente se sometió a baño María a una temperatura de 54 °C por 20 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 3000 min^{-1} .

El procedimiento antes descrito se llevó a cabo sustituyendo el microencapsulado por la solución de aspirina en las mismas concentraciones (1; 1,5; 2; 2,5 mg/ml), para finalizar se midió la absorbancia de los sobrenadantes de cada ensayo en el espectrofotómetro UVVIS Fisher Scientificacu Skan Go a una longitud de onda de 540 nm. Para la lectura del blanco se utilizó tampón fosfato y se realizó ensayos por triplicado. (**Rashid, 2011**)

En la determinación del porcentaje de actividad antiinflamatoria se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad antiinflamatoria} = \left(1 - \frac{Abs_2 - Abs_1}{Abs_3 - Abs_1} \right) * 100$$

Ecuación 6 Porcentaje de actividad antiinflamatoria

2.3 Procesamiento y análisis de datos

2.3.1 Diseño Experimental

El procesamiento de datos y la selección del mejor tratamiento en el proceso de extracción de antocianinas se aplicó el diseño experimental 2² (A x B) con tres réplicas en cada uno de los tratamientos, mediante el diseño de Superficie de Respuesta que permite al investigador examinar una respuesta que se puede mostrar como una superficie. Se tomó en cuenta que en el experimento se investiga el efecto de la variación de factores cuantitativos en los valores que puede tomar una variable dependiente o de respuesta.

En las siguientes tablas se observa los factores y combinación del diseño experimental.

Tabla 5.- Estructura del diseño experimental

FACTORES (A x B)	NIVELES
A: Relación de materia vegetal /volumen disolvente (EtOH y HCl relación 85:15)	r1: Relación 1:20
	r2: Relación 1:25
B: Tiempo (minutos)	t1: 60
	t2: 120

Tabla 6.- Distribución de tratamientos

INTERACCIÓN	TRATAMIENTO
r1t1	Relación 1:20, 60 minutos
r1t2	Relación 1:20, 120 minutos
r2t1	Relación 1:25, 60 minutos
r2t2	Relación 1:25, 120 minutos

Mediante el software estadístico Statgraphics Centurión versión XVI.I se analizaron los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, de igual manera los resultados de la actividad antiinflamatoria a través de gráficas de comparación.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Caracterización fisicoquímica del fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L)

3.1.1.1 Caracterización física del fréjol

En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de longitud, diámetro, peso, volumen y densidad de la materia prima utilizada para la extracción de antocianinas.

Tabla 7.- Características físicas del fréjol rojo

N° Unidades	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Peso (g) Unidad	Peso (g) 10 unidades	Volumen (ml) 10 unidades	Densidad (g/ml)
1	1,8	1,2	1,4926	16,4378	16	1,0273
2	1,9	1,3	1,6735	16,5148	16	1,0321
3	1,9	1,1	2,0934	16,2439	16	1,0152
4	2	1,2	1,6929	16,3245	16	1,0202
5	2	1,2	1,6808	16,4312	16	1,0269
6	1,9	1,4	1,4656	16,5614	16	1,0350
7	1,8	1,3	1,6208	16,2456	16	1,0153
8	2	1,1	1,5575	16,2434	16	1,0152
9	1,8	1,1	1,5209	16,4534	16	1,0283
10	1,9	1,3	1,6398	16,3212	16	1,0200
Promedio	1,9	1,22	1,6437	16,3777	16	1,0236

El diámetro del fréjol oscila entre 1,1 y 1,4 cm; mientras que la longitud se encuentra en un rango de 1,8 y 2 cm. Según las investigaciones realizadas por **Peralta, Mazón, Rodríguez, & Murillo, 2014** de diferentes tipos de fréjol rojo en el Ecuador establece que el diámetro oscila entre 0,61 y 1,3 cm y la longitud entre 0,973 y 2,2 cm. Además, manifiestan que el peso de 100 unidades de fréjol tiene un rango entre 55-58 gramos. La densidad del fréjol se realizó con 10 unidades y se obtuvo un valor promedio de $1,0236 \pm 0,007$ g/ml, en estudios realizados por (**Espinosa-Pérez et al., 2015**) reportó un valor similar de $1,26 \pm 0,15$ g/ml.

3.1.1.2 Determinación del color

Mediante un colorímetro marca Lovibond LC 100 previamente calibrado se midió 10 veces las 10 muestras de fréjol, se determinaron las coordenadas cromáticas

L*(Luminosidad), a*(Componente rojo-verde) y b*(componente amarillo-azul) basándose al espacio de color CIELab, el cual establece que dos colores no pueden ser rojo y verde al mismo tiempo o amarillo y azul al mismo tiempo

(“Entendiendo El

Espacio de Color CIE L*A*B*,” n.d.); es por ello que para a* (+a indica rojo, -a indica verde) de igual manera para b* (+b indica amarillo, -b indica azul) Los resultados promedios de los parámetros fueron positivos $48,2 \pm 1,81$ para L*, $34,63 \pm 3,06$ para a* y $9,05 \pm 0,81$ para b* (Ver anexo 1).

Además los resultados se evaluaron en la web mediante Encycolorpedia, que tiene como objetivo mostrar los esquemas de colores, combinaciones y conversiones de color. **(“Esquemas de Color Hexagonal, Pesquisa de Pintura, Paletas de Colores y Conversiones,” n.d.)** su composición fue de 67,45 % de rojo, 35,29 % de verde y 39,61 % de azul. (Ver anexo 2)

3.1.1.3 Determinación del Potencial de Hidrógeno (pH)

El pH se determinó mediante la utilización de un pH-metro digital (ORION 420A), el valor promedio de pH fue de 6,16 (Ver Anexo 3) muy parecido a lo reportado por **(Casabon-Garcín et al., 2018)** 6,05; esto concuerda con lo establecido por la revista Mexicana de Alimentos, la cual indica que la mayoría de los alimentos son naturalmente ácidos por presentar valores de pH menores a 7 y es sumamente importante en lo que respecta a la seguridad alimentaria.

3.1.1.4 Determinación de sólidos solubles (°Brix)

La determinación de sólidos totales (°Brix) se realizó mediante la utilización de un refractómetro (ATACO Pocket-Japón), en esta investigación se obtuvo 3,1 °Brix; (Ver

Anexo 3) esto significa un 3,1 % de contenido de azúcar en 100 g de solución, resultados similares fueron reportados por (Ríos & Quiros, 2015) con 3 °Brix.

3.1.2 Obtención del extracto vegetal líquido

En el proceso de extracción de antocianinas a partir de granos de fréjol rojo se tomó en consideración: Factor A (relación material vegetal / volumen de disolvente) y Factor B (tiempo de extracción) para ello se cuantificó el contenido de antocianinas en cada uno de los tratamientos. (Ver anexo 4)

Según estudios realizados por (Heras, Alvis, & Arrazola, 2013) establece que para la extracción de antocianinas es ideal utilizar un disolvente de etanol acidificado en tal estudio se realizaron extracciones con ácido ortofosfórico y ácido clorhídrico, el disolvente utilizado en la extracción de antocianinas de fréjol rojo fue etanol al 96 % y ácido clorhídrico al 37 % con una relación 85:15 que permite extraer mayor cantidad de antocianinas. En la figura 2 se muestra el diagrama de Pareto.

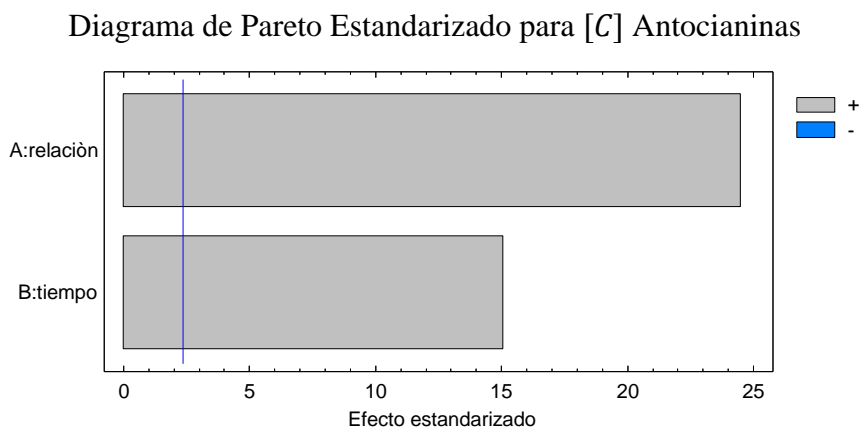


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado

Mediante el resultado del análisis de varianza se pudieron determinar las condiciones de extracción en el cual se observa que tanto el factor A como el factor B tiene influencia significativa en la extracción con un valor de ($p < 0,05$) con un 95 % de confianza, la interacción de los factores A y B no tiene una influencia significativa es decir no influye directamente en la extracción. Según (Martínez Rodríguez, 2005) cuando el valor de R^2

sea más cercano a 1 establece que el ajuste del modelo es adecuado al igual que en la experimentación se obtuvo un modelo con un ajuste de $R^2 = 0,9916$ muy cercano a 1 (Ver Anexo 5)

En la Figura 2 se puede observar la interacción de los factores mediante un diagrama de Pareto, el cual se ve influenciado el proceso de extracción de antocianinas. El factor A tiene mayor relevancia con respecto al factor B, es decir tiene mayor importancia la relación del material vegetal/ volumen disolvente que el tiempo de extracción.

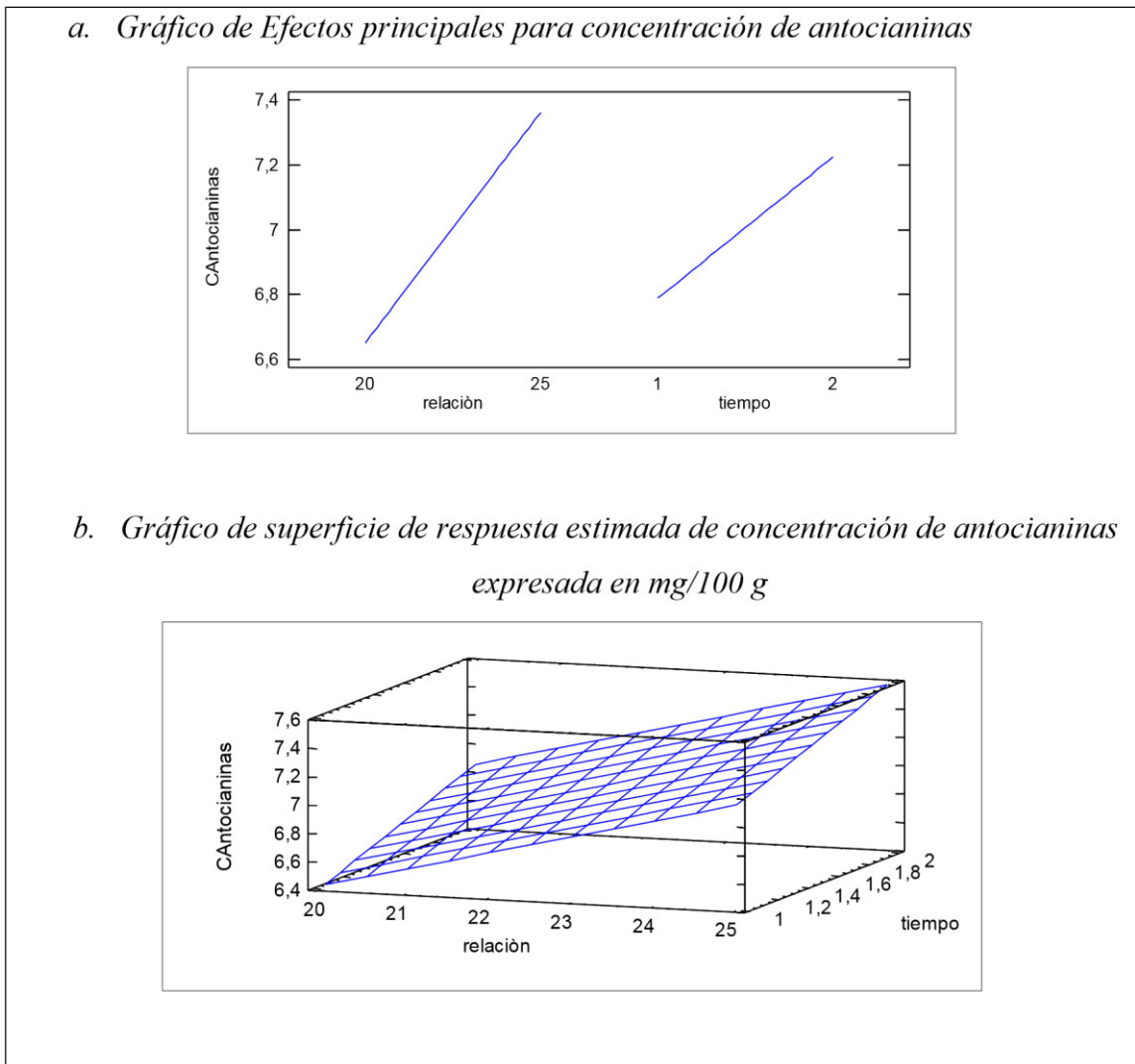


Figura 3.- a. Efectos principales para concentración de antocianinas. b. Superficie de respuesta estimada

Por otra parte, en la Figura 3a se observa claramente que existe una mayor concentración de antocianinas a la relación 1:25 al existir una relación directamente proporcional, mientras mayor es la relación de materia vegetal / volumen de disolvente aumenta considerablemente la concentración de antocianinas, de igual manera ocurre con el tiempo, en las dos horas de extracción se obtuvo mayor cantidad de antocianinas, lo dicho anteriormente se contrastó con el gráfico de superficie de respuesta (Ver Figura 3b). La concentración más alta de antocianinas se obtuvo mediante la relación 1:25 (materia vegetal/ volumen disolvente) durante 2 horas de ebullición a una temperatura constante de 70 °C y es 7,3 mg/100 g. De acuerdo a investigaciones realizadas por **(Salinas, Rojas, & Sosa, 2009)** establecen que la concentración de antocianinas en diferentes variedades de fréjol oscilan entre 10,1 y 18,1 mg/100 g, esto depende de la elección del mejor disolvente y tiempo de extracción.

Una vez analizado la relación materia vegetal/ volumen disolvente se establece que no existe una saturación evidente del disolvente por lo tanto es recomendable analizar a mayores relaciones con el fin de obtener mayor concentración de antocianinas que las alcanzadas bajo este diseño.

3.1.3 Microencapsulación mediante secado por aspersión

En la técnica de microencapsulación mediante secado por aspersión o también conocida como Spray drying se obtuvo un polvo fino en forma de microesferas, que engloba o recubre compuestos bioactivos que son sensibles a la luz, pH, humedad y temperatura; para ello se evaluaron dos matrices poliméricas que influyen directamente en la eficiencia del proceso de microencapsulación. Se utilizó una relación 20:80 (matriz polimérica/ extracto concentrado), las matrices poliméricas utilizadas fueron maltodextrina y una mezcla de 50:50 de maltodextrina - goma arábiga para la elección de la mejor matriz polimérica se realizó la comparación de la eficiencia entre matrices.

Según **(García, Gonzalez, Ochoa, & Medrano, 2014)** la maltodextrina es una buena matriz por su costo, y efectividad además de proporcionar baja viscosidad a una alta proporción de sólidos inodoros e incoloros, permite la formación de polvos de libre flujo

sin enmascarar el sabor original, la goma arábica al igual que la maltodextrina tiene baja viscosidad y además aporta con un bajo contenido calórico que lo hace ideal para la microencapsulación a partir de investigaciones realizadas por **(Madene & Jacquot, 2006)**.

A continuación, en la Figura 4 se muestran los resultados de la prueba de múltiples rangos de Duncan para la eficiencia de microencapsulación.

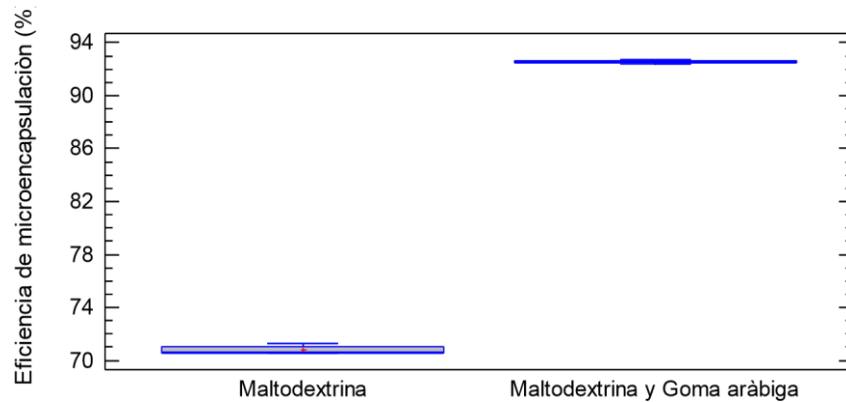


Figura 4.- Eficiencia de microencapsulación (%) de las matrices poliméricas

Mediante la Ecuación 3 se determinó el porcentaje de eficiencia de microencapsulación (Ver anexo 6), se realizó el análisis de varianza de los resultados de la eficiencia de microencapsulación (Ver anexo7) la comparación entre las matrices poliméricas tiene diferencia significativa con un 95 % de confianza.

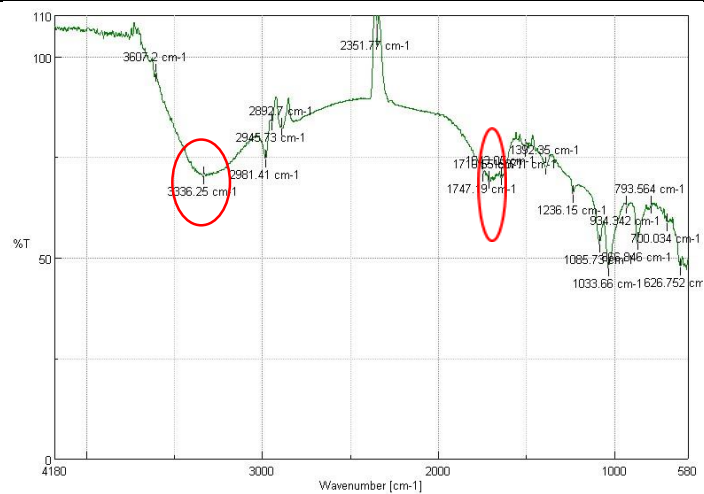
En la Figura 4 se observa que la eficiencia de microencapsulación con la maltodextrina alcanzó un valor medio de 70,76 % en estudios realizados por **(P. M. Figueroa, Ceballos, & Hurtado, 2016)** presenta valores similares con 70 % en la microencapsulación de aceite de mora, al igual que **(Arrazola, Herazo, & Alvis, 2014)** obtuvo valores levemente superiores en microencapsulación de antocianinas de berenjena con 72,6 %. Con la mezcla 50:50 maltodextrina y goma arábica se obtuvo un valor superior al de la maltodextrina con un 92,52 %, al comparar con investigaciones realizadas por **(López, Márquez, Mayo, Toledo, & Pérez, 2009)** obtuvo un valor menor, con 90 % en la eficiencia de microencapsulación de aceites de semillas. **(Lopera, Guzmán, Cataño, & Gallardo,**

2009) presenta la mezcla de polímeros a diferentes relaciones, la mejor relación en ese estudio fue 50:50 (maltodextrina-goma arábica) con un 97 % de eficiencia de microencapsulación.

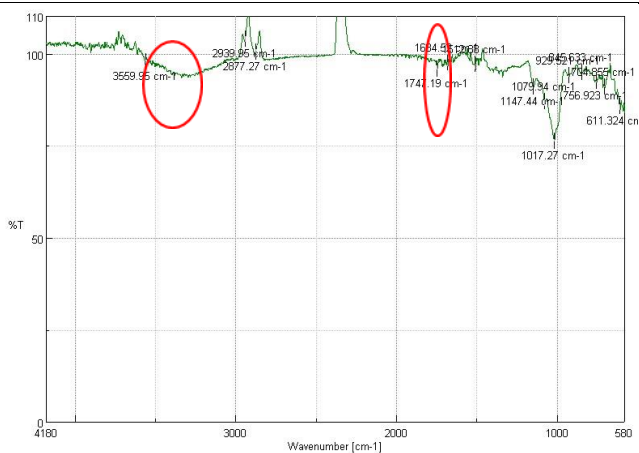
Es importante recalcar que en este estudio la mezcla con una relación 50:50 (maltodextrina-goma arábica) tuvo mejor porcentaje de eficiencia que la maltodextrina esto se debe a que según (Fang & Bhandari, 2011) además de la viscosidad de la matriz polimérica, la pérdida de polvo durante el proceso de secado está directamente asociada al bajo rendimiento de microencapsulación, debido a la acumulación de partículas de polvo sobre la pared de la cámara y el ciclón.

3.1.4 Análisis de Espectrofotometría Infrarroja FT-IR

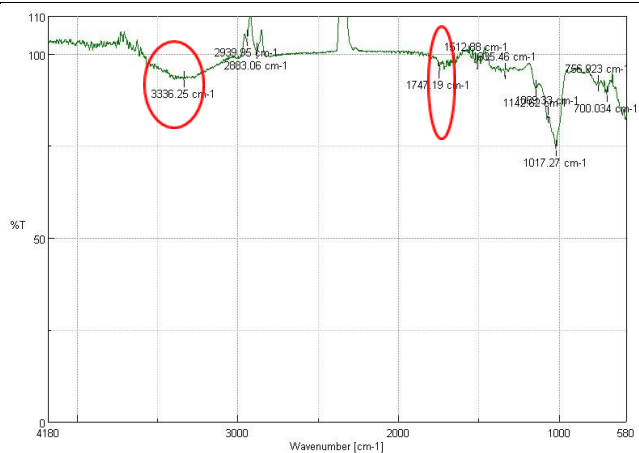
El análisis de espectrofotometría infrarroja se realizó en muestras de antocianinas extraídas del fréjol rojo antes y después de la microencapsulación, este análisis tiene como objetivo corroborar los resultados obtenidos en la eficiencia de microencapsulación.



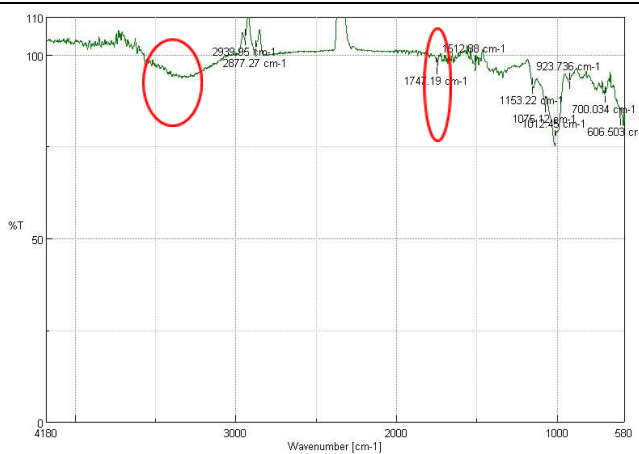
a. Antocianinas de fréjol rojo sin microencapsular



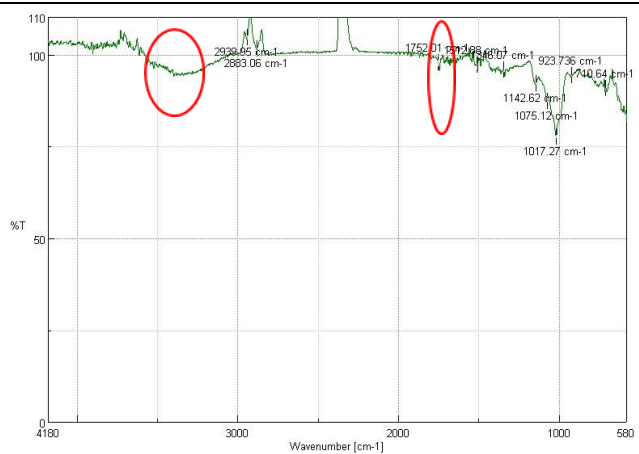
b. Antocianinas de fréjol rojo microencapsuladas con maltodextrina



c. Antocianinas de fréjol rojo microencapsuladas con maltodextrina y goma arábica (50:50)



d. Maltodextrina



e. Mezcla de polímeros maltodextrina y goma arábica (50:50)

Figura 5.- Espectrofotometría Infrarroja FT-IR

En la Figura 5a se puede observar el espectro de las antocianinas extraídas del fréjol rojo sin la aplicación de ninguna matriz polimérica microencapsulante, las bandas más representativas tienen valores de $3336,25\text{ cm}^{-1}$ y $1747,19\text{ cm}^{-1}$, valores semejantes fueron publicados por (Sivam, Sun-Waterhouse, Perera, & Waterhouse, 2012) en estudios de FT-IR de flavonoides específicamente las antocianinas. Mediante estudios realizados por (Hussain & Mahmoud, 2011) reportan bandas similares a los obtenidos de antocianinas extraídas de cereza 3429 grupo hidroxilo, $1724,92\text{ cm}^{-1}$ para el grupo carbonilo.

En la Figura 5b y 5c se puede observar que la banda del grupo hidroxilo desaparece es decir el polímero recubre al grupo funcional formando una pared que protege a las antocianinas, en la figura 5d y 5e se representa las bandas de la matriz polimérica maltodextrina y la mezcla de polímeros (maltodextrina y goma arábiga) respectivamente. Se puede constatar que efectivamente se microencapsuló correctamente las antocianinas debido a que las bandas de las figuras 5b y 5d son similares, al igual que las figuras 5c y 5e. Estos resultados obtenidos confirman la eficiencia de microencapsulación mediante la técnica secado por aspersión.

3.1.5 Determinación del potencial antioxidante del extracto *in vitro*

La determinación del potencial antioxidante tiene como objetivo la reducción del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en presencia de compuestos bioactivos donadores de hidrógeno como las antocianinas que son estudiados por su alto poder antioxidante. (Guija et al., 2015). Se realizó un análisis de varianza con un 95 % de confianza a través del método de determinación de potencial antioxidante *in vitro* DPPH, establece un valor de ($p < 0,05$) por tanto, existe una diferencia significativa entre las matrices poliméricas analizadas, dando como resultado que la mezcla de polímeros tiene un porcentaje de inhibición superior en comparación con la maltodextrina.

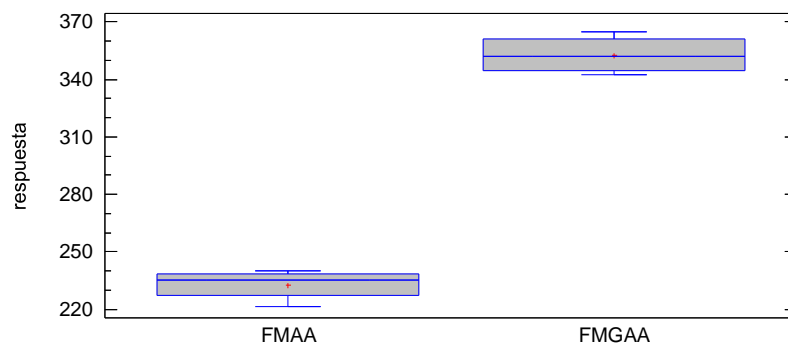


Figura 6.- Actividad antioxidante *in vitro* de los microencapsulados

En la Figura 6 se presenta mediante el diagrama de cajas y bigotes la comparación de la actividad antioxidante, además se observa el resultado de la prueba de múltiples rangos de Duncan que establece una diferencia significativa en la actividad antioxidante *in vitro* entre las matrices poliméricas.

Se calculó el porcentaje de inhibición para cada muestra con la Ecuación 5, los valores obtenidos se graficaron frente a la concentración de Trolox (μmol), seguidamente se obtuvo la ecuación de la regresión lineal (Ver anexo 10), los resultados son 232,78 y 352,82 μmol Trolox para la maltodextrina y mezcla respectivamente. Conviene enfatizar que los resultados de la mezcla fueron superiores a la de la maltodextrina; en comparación con estudios realizados por (Alvarado-López et al., 2019) presenta valores de 354 μmol Trolox/g de extracto seco, similares a los obtenidos en la experimentación, de igual manera en el análisis de microencapsulado de Mashua reportaron una concentración de 352,89 μmol Trolox/g de extracto seco (Orellano Gonzales & Valverde Torres, 2017). Además en la investigación realizada por (Puertas, Mosquera-Mosquera, & Rojano, 2016) establece que en diferentes clases de fréjol existe una alta capacidad antioxidante que incluso supera la capacidad de vitaminas, por lo tanto las antocianinas extraídas del fréjol son útiles para la implementación en la industria farmacéutica al reemplazar los compuestos químicos por naturales.

3.1.6 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vivo*

Los microorganismos aeróbicos para cumplir sus funciones vitales necesitan de oxígeno y obtienen energía química (ATP) por lo tanto, cuando la concentración de oxígeno aumenta se transforma en un agente tóxico para la célula, es por ellos que se producen especies reactivas del oxígeno conocidas por sus siglas en inglés ROS (Reactive Oxygen Species), tales especies modifican su estructura y función cuando reaccionan con diferentes macromoléculas, sin embargo cuando los mecanismos de defensa del microorganismo disminuye provoca un desbalance que se lo conoce como estrés oxidativo lo cual conduce al envejecimiento y muerte celular. (Mera, 2018)

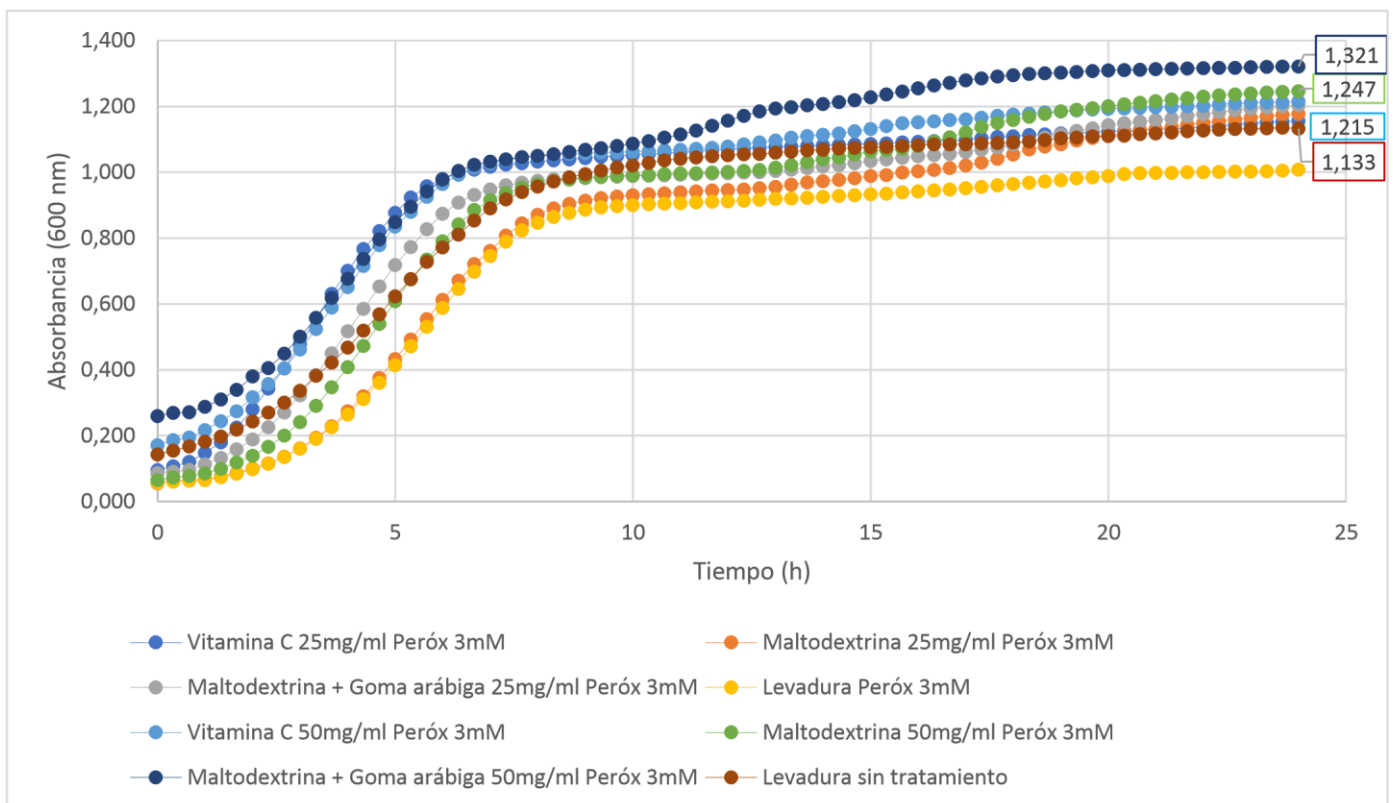


Figura 7.- Curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* para la evaluación de la actividad antioxidante *in vivo*

En la evaluación de la capacidad antioxidante *in vivo* se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo modelo, vitamina C como control positivo y peróxido de hidrógeno como causante de estrés oxidativo. Mediante la investigación realizada por **(Fiallos, 2017)** establece que la turbidez es un indicador de apariencia óptica en donde está directamente relacionada con la concentración de biomasa en el caldo mediante la espectrofotometría UV-Vis, por lo tanto en la figura 7 se puede observar claramente el crecimiento de la levadura en un periodo de 24 horas; es conveniente señalar que en el caso de la levadura sin ningún tratamiento oxidante (peróxido de hidrógeno) y antioxidante (microencapsulado o vitamina C) se puede evidenciar un crecimiento normal del microorganismo, empezando en la fase de adaptación hasta la fase estacionaria en donde se puede observar el punto máximo de absorbancia de 1,133; por el contrario cuando el microorganismo se somete a estrés oxidativo mediante la adición de peróxido de hidrógeno se observa en la curva un crecimiento limitado y a pesar de no tener un agente antioxidante alcanza un crecimiento máximo con una absorbancia de 1,008, esto se puede corroborar con lo mencionado por **(Wu et al., 2011)** señala que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene mecanismos de defensa celular en contra del peróxido de hidrógeno, la primera barrera con los sistemas enzimáticos, entre los que se pueden destacar a la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa además existen sistemas no enzimáticos como flavonoides, glutatión reducido y vitaminas C y D, estos mecanismos tiene la particularidad de estabilizar los ROS.

Por otra parte, se aplicaron tratamientos antioxidantes de vitamina C y microencapsulados de fréjol rojo a dos concentraciones diferentes 25 mg/ml y 50 mg/ml, al comparar los valores de absorbancia entre los microencapsulados a una concentración de 25 mg/ml se obtuvo los siguientes valores 1,178 y 1,203 de maltodextrina y mezcla maltodextrina- y goma arábica respectivamente, el valor de absorbancia de la vitamina C a la misma concentración fue menor a la de los microencapsulados con 1,156 por lo tanto se puede concluir que los microencapsulados tienen mayor poder antioxidante que la vitamina C comercial. Al comparar con la investigación de **(Mejía, 2019)** y **(Ramos, 2019)** reportaron valores similares de absorbancia en el microencapsulado de antocianinas de

capulí con maltodextrina 1,205 y 1,186 para antocianinas de col morada microencapsuladas con maltodextrina.

Del mismo modo ocurrió con los microencapsulados y vitamina C a una concentración de 50 mg/ml, el valor de absorbancia de la vitamina C fue 1,215 menor a los obtenidos por los microencapsulados 1,247 maltodextrina y el valor más alto de toda la curva 1,321 de la mezcla maltodextrina - goma arábica.

Los resultados mencionados anteriormente evidencian que los microencapsulados tienen una elevada actividad antioxidante permitiendo de tal manera la protección a la levadura contra el estrés oxidativo que genera el peróxido de hidrógeno. Según **(Peláez, 2016)** asegura que los flavonoides tiene una actividad antioxidante natural que tienen como objetivo proteger de la oxidación de ADN y disminuir las enfermedades cardiovasculares y degenerativas causadas por los radicales libres.

3.1.7 Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante el método de estabilización de membrana de eritrocitos

En la determinación de la actividad antiinflamatoria se usó ácido acetil salicílico (Aspirina), fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) como fármaco estándar de referencia y los extractos microencapsulados de antocianinas de fréjol rojo como fármaco de prueba.

Según la investigación realizada por **(García López, 2016)** establece que el incremento de la temperatura ocasiona un aumento de la vibración celular causando el debilitamiento de las fuerzas intermoleculares lo que conlleva a la ruptura de la pared celular; los extractos microencapsulados permitieron la estabilización de la membrana de eritrocitos frente al factor temperatura por lo cual se pudo determinar el porcentaje de protección de membrana. En la figura 8 se muestra el análisis de varianza con un 95 % de confianza realizado a través del método de estabilización de membrana de eritrocitos, establece un valor de ($p < 0,05$), por lo tanto, existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos (Ver Anexo11)

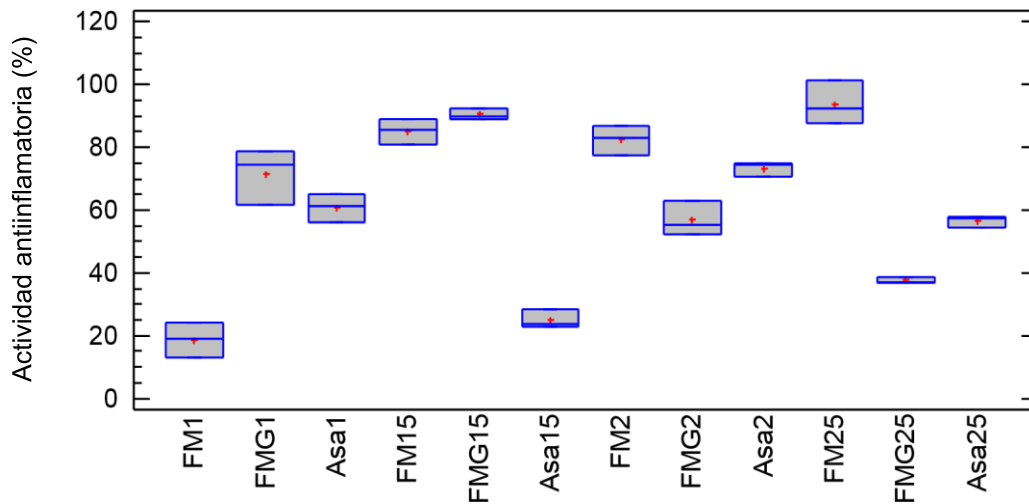


Figura 8.- Comparación del porcentaje de actividad antiinflamatoria de los microencapsulados con el fármaco estándar de referencia

En la Figura 8 se presentan los resultados del porcentaje de actividad antiinflamatoria mediante el diagrama de cajas y bigotes. El microencapsulado de fréjol rojo con la mezcla de matrices 50:50 (Maltodextrina y Goma arábica) a una concentración de 1,5 mg/ml presentó un valor de 90,55 % la mayor actividad antiinflamatoria con respecto a esa matriz polimérica al comparar con la aspirina a la misma concentración presento un valor muy bajo con solo 24,89 %; A la concentración de 1 mg/ml se obtuvo un valor de 71,61 % similar a lo reportado por **(Morales, 2018)** 64,11 % que evaluó la actividad antiinflamatoria de antocianinas de fréjol rojo moteado a la misma concentración.

Por otro lado, el microencapsulado con la matriz maltodextrina a una concentración de 2,5 mg/ml presentó 93,70 % siendo el mayor porcentaje con respecto a las otras muestras, en comparación con el fármaco estándar de referencia (Aspirina) presentó un valor bajo con 56,49 % a la misma concentración del microencapsulado antes mencionado. La Aspirina presentó un valor de 60,96 % a una concentración de 1 mg/ml similar a lo reportado por **(Vásquez, 2018)** con 56,37 % a la mismo concentración, el valor más alto reportado por la aspirina fue 73,26 % a una concentración de 2 mg/ml. El mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria se presentó en la matriz polimérica maltodextrina esto se debe a que al estar solo formado por una sola matriz permite mayor liberación del principio activo al

medio, aunque su variación no fue tan elevada con respecto a la mezcla de matrices 93,70 % y 90,55 % respectivamente.

La membrana de eritrocitos es similar a la membrana lisosómica (**Kumar et al., 2011**) y debido a su estabilización se puede establecer que los extractos microencapsulados de fréjol también puede estabilizar membranas lisosómicas. Además, la membrana lisosómica es importante para limitar la respuesta inflamatoria y evitar la liberación de constituyentes lisosomales de neutrófilos activados como enzimas bactericidas y proteasas que causan más inflamación y daño tisular. (**Moya, 2017**)

Por lo tanto, es importante recalcar que varios estudios han demostrado que los extractos que contienen polifenoles a partir de fuentes naturales además de presentar un alto poder antioxidante poseen actividad antiinflamatoria que ayuda a combatir diferentes tipos de enfermedades del sistema inmune que hoy en día son más comunes en la sociedad.

3.2 Verificación de la Hipótesis

Se analizó los datos obtenidos en la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los microencapsulados de fréjol rojo

- Se rechaza la hipótesis nula.
- Se acepta la hipótesis alternativa, es decir las antocianinas de fréjol rojo microencapsuladas presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Las mejores condiciones de extracción de antocianinas presentes en los granos de fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L) son relación 1:25 material vegetal / volumen de disolvente, con un tiempo de 120 minutos manteniendo una temperatura constante de 70 °C.
- Se microencapsularon las antocianinas extraídas mediante secado por aspersion con dos matrices poliméricas: maltodextrina y una mezcla de maltodextrina y goma arábiga con una relación 50:50, alcanzándose una eficiencia de microencapsulación mayor con la mezcla, siendo de 92,52 %, y con la maltodextrina de 70,76 %, estos resultados se corroboraron al realizar el análisis de espectrofotometría infrarroja FT-IR en donde se demostró que las antocianinas fueron cubiertas por las diferentes matrices.
- Se evaluó la actividad antioxidante de las antocianinas microencapsuladas a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*. El ensayo DPPH (*in vitro*) arrojó como resultados 232,78 y 352,82 μmol equivalentes de Trolox/g de microencapsulado para la maltodextrina y mezcla respectivamente. En la técnica *in vivo* se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* la cual presentó curvas de crecimiento que confirman el efecto antioxidante que proporcionan los microencapsulados al compararse con la Vitamina C.
- Se determinó el potencial antiinflamatorio de las antocianinas microencapsuladas por el método de estabilización de membrana de eritrocitos, las antocianinas microencapsuladas con maltodextrina obtuvo una actividad antiinflamatoria de 93,70 % a una concentración de 2,5 mg/ml y las microencapsuladas con la mezcla a una concentración de 1,5 mg/ml tuvo una actividad de 90,95 %, al comparar con el estándar de ácido acetil salicílico que presentó su mayor actividad de 60,89 % a una concentración de 1 mg/ml.

4.2 RECOMENDACIONES

- Estudiar la extracción con otros tipos de disolventes que ayuden a obtener la mayor cantidad de metabolitos.
- Evaluar otros tipos de matrices poliméricas para la microencapsulación y comparar la eficiencia de microencapsulación.
- Para el ensayo de actividad antioxidante *in vivo* utilizar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* certificadas para un mejor crecimiento de la levadura.
- Realizar la prueba *in vitro* de la actividad antiinflamatoria por inhibición de desnaturalización de albúmina y comparar con la estabilización de membrana de eritrocitos.

MATERIAL DE REFERENCIA

5.1 Referencia Bibliográfica

- Abdel-Aal, E. S. M., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3), 350–354. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- Alvarado-López, A. N., Gómez-Oliván, L. M., Heredia, J. B., Baeza-Jiménez, R., Garcia-Galindo, H. S., & Lopez-Martinez, L. X. (2019). Nutritional and bioactive characteristics of Ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.): An underutilized legume harvested in Mexico . *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 199–206. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1571530>
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por aspersion y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. *Informacion Tecnologica*, 25(3), 31–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>
- Beaver, J., Kelly, J., & Myers, J. (2010). a Voluntary Y and Informal Org To Effect the Exchange of Information and Materials. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 53, 330.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bouvier, J., Stragier, P., Morales, V., Re, E., & Gutierrez, C. (2008). Lysine Represses Transcription of the. *Society*, 190(15), 5224–5229. <https://doi.org/10.1128/JB.01782-07>
- Burgos, C., Steve, K., Reyes, R., Guillermo, S., Yupanqui, G., & Luis, M. (2016).

- Antocianinas totales y capacidad antioxidante in vitro de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* “ Arándano ,” 8(1), 44–48.
- Casaubon-Garcín, P., Lamshing-Salinas, P., Isoard-Acosta, F., Casaubon Lemen-Meyer, S., Delgado-Franco, D., & Bertha Pérez-Lizaur, A. (2018). pH de los alimentos: ¿una herramienta para el manejo de los pacientes con refl ujo gastroesofágico?, 85(3), 89–94. Retrieved from www.medigraphic.com/rmp
- César, I., Valladares, A., & Ceiba, L. (2010). Serie Lecturas Obligatorias Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos)*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, 22(March), 179–192. <https://doi.org/10.1080/02652040400026533>
- Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B*. (n.d.). Retrieved October 24, 2019, from <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-decolor-cie-lab/>
- Espinosa-Pérez, E. N., Ramírez-Vallejo, P., Magdalena Crosby-Galván, M., Arturo Estrada-Gómez, J., Lucas-Florentino, B., & Chávez-Servia, J. L. (2015). Classification of common dry bean landraces from the south-center of México by seed morphology. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(1), 29–38.
- Espinosa; Sánchez. (2014). Arquímedes y la tecnología educativa: un análisis crítico en torno a los MOOC.
- Esquemas de Color Hexagonal, Pesquisa de Pintura, Paletas de Colores y Conversiones. (n.d.). Retrieved October 24, 2019, from <https://encycolorpedia.es/>

- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3), 1139–1147.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.093>
- Ferreira, E., Stringheta, P., & Cano, M. (2007). Stability of anthocyanin in spinach vine (Basella rubra) fruits. *Ciencia e Investigación Agraria*, 34(2), 85–90.
<https://doi.org/10.7764/rcia.v34i2.389>
- Fiallos, J. (2017). *Determinación de la correlación entre Métodos visuales, Ópticos y Difusión en placa en el crecimiento de Escherichia coli*.
- Figueroa, P. M., Ceballos, M. A., & Hurtado, A. M. (2016). Microencapsulação por secagem por atomização de óleo de amora (Rubus glaucus) extraído com CO₂ supercrítico. *Revista Colombiana de Química*, 45(2), 39–47.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.57481>
- Figueroa, R., Tamayo, J., González, S., & Moreno, G. (2011). Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (Hylocereus undatus). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12(1), 44–50.
- García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F., & Velázquez, E. (2010). Phaseolus vulgaris is nodulated in northern Spain by Rhizobium leguminosarum strains harboring two nodc alleles present in American Rhizobium etli strains: Biogeographical and evolutionary implications. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), 657–666. <https://doi.org/10.1139/W10-048>
- García, Ceja, E. al. (2012). Garcia-Ceja-et-al-2012 biopolímeros en la microencapsulación.pdf.
- García, C., Gonzalez, L., Ochoa, M., & Medrano, R. (2014). MICROENCAPSULACIÓN DE JUGO DE CEBADA VERDE MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN, 4(4), 262–266.

- García López, E. B. (2016). Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de macroalgas de baja California sur, México., 19. Retrieved from <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/Medios/tesis/garcialop1.pdf>
- Garzón, G. (2008). LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS : REVISIÓN Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds . A Review.
- Graduados, E. De, Teja, C. I., Teja, C. I., Science, T., & Ah-hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible Color in food as a measurable quality criterion, *42*(2), 57–66. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>
- Guija, E., Camones, M., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2, 2Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante, *2*(1), 0–3.
- Guillamon, E. (2018). Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, *59*(3), 185–196. <https://doi.org/10.30827/ars.v59i3.7479>
- Gusti, M., Rodríguez, L. E., & Wrolstad, R. E. (1999). Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins.
- 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.). *Informacion Tecnologica*, *24*(5), 93–102. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500011>
- Hussain, M. a., & Mahmoud, K. M. (2011). Isolation and Identification of an Anthocyanin Compound from Cherry Fruit (*Prunus Avium* L .) and Study of its Antibacterial Activity. *Tikrit Journal of Pure Science*, *16*(2), 2–6.
- INEN-ISO-2173, N. (2013). Norma Técnica Ecuatoriana-Productos Vegetales y de Frutas-Determinación de sólidos solubles-Método refractométrico (IDT), 2003.

- Kechinski, C. P., Guimarães, P. V. R., Noreña, C. P. Z., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2010). Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. *Journal of Food Science*, 75(2), 173–176.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01479.x>
- Kumar, V., Bhat, Z. A., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). International Journal of Drug Development & Research Available online <http://www.ijddr.in> Covered in Official Product of Elsevier , The Netherlands © 2010 IJDDR IN-VITRO ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF LEAF EXTRACTS OF BASELLA ALBA LINN . VAR . ALBA, 3(2), 176–179.
- Leyva Daniel, D. E. (2009). Determinacion De Antocianinas, Fenoles Totales Y Actividad Antioxidante En Licores Y Frutos De Mora, 1–80.
- Lopera, S. M. C., Guzmán, C. O., Cataño, C. R., & Gallardo, C. C. (2009). Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersión, utilizando goma arábiga y maltodextrina como materiales de pared. *Vitae*, 16(1), 55–65.
- López, O., Márquez, T., Mayo, O., Toledo, C., & Pérez, E. (2009). Características del Aceite de Semillas de Cucurbita pepo L. Microencapsulado mediante Secado por Aspersión con Maltodextrina y Goma Arábiga. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(4), 629.
- Madene, A., & Jacquot, M. (2006). Review Flavour encapsulation and controlled release – a review, 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
- Martínez Rodríguez, M. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico y Económico Escorialense*, (38), 315–331.
- Mejía, A. (2019). *Extracción, microencapsulación y actividad antioxidante de antocianinas de capulí (Prunus serotina)* (Vol. 23).

- Mera, A. (2018). Evaluación de la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii*.
- Morales, Á. (2018). Determinación de actividad antiinflamatoria y antimicrobiana en concentrados e hidrolizados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad tunkahuan y fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Moya, E. (2017). Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro de los extractos vegetales de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*), obtenidos mediante secado por aspersión.
- Nizori, A., Bui, L. T. T., & Small, D. M. (2012). Microencapsulation of Ascorbic Acid by Spray Drying : Influence of Process Conditions, *6*(12), 1123–1127.
- NTE INEC-ISO 1842. (2013). Norma técnica- Productos Vegetales y de Frutas Determinación de pH (IDT), 1991.
- Orellano Gonzales, E. V., & Valverde Torres, J. M. (2017). Propiedades físicas, antocianinas y capacidad antioxidante del atomizado de Mashua (*Tropaeolum Tuberosum*) encapsulado con maltodextrina. *Universidad Nacional Del Centro Del Perú*. Retrieved from <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/4776>
- Ortíz, M. A., Reza, C., Gerardo, R., Madinaveitia, C., Ciencias, F. De, Universidad, Q., ... Artículo, A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas, 16–22.
- Peláez, A. (2016). Validación funcional de extractos polifenólicos de cacao mediante ensayos.
- Peralta, E., Mazón, N., Rodríguez, D., & Murillo, Á. (2014). *Catálogo de variedades mejoradas de fréjol arbustivo para los valles y estribaciones de la sierra ecuatoriana*. Retrieved from www.iniap.gob.ec
- Puertas, M. A., Mosquera-Mosquera, N., & Rojano, B. (2016). Estudio de la capacidad antioxidante in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) mediante extracción asistida por microondas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *21*(1), 42–50. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-

47962016000100005

- Ramírez-Pérez, A. R., Díaz-Ruiz, R., Jacinto-Hernández, C., Paredes-Sánchez, J. A., & Garza García, R. (2018). Diversidad de frijoles nativos de diferentes regiones del estado de Puebla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 467–480. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i3.1442>
- Ramos, E. (2019). *Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de col morada (Brassica oleracea L.)* (Vol. 23).
- Rashid, M. A. (2011). MEMBRANE STABILIZING ACTIVITY - A POSSIBLE MECHANISM OF ACTION FOR THE ANTI- INFLAMMATORY ACTIVITY OF TWO BANGLADESHI MEDICINAL PLANTS : MESUA NAGASSARIUM (BURM . F .) AND KIGELIA PINNATA (JACK) DC . , 3(0974), 1–5.
- Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*.
- Ríos, M., & Quiros, J. (2015). El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) : cultivo, beneficio y variedades, 193.
- Rodríguez, L., & Fernández, X. (2004). Beans (*Phaseolus vulgaris*) : their contribution to the diet of Costa Ricans. *Agronomía Mesoamérica*, 15(3), 263–275.
- Salinas, Y., Rojas, L., & Sosa, E. (2009). Composición de antocianinas en variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México.
- Shishir, M. R. I., & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science and Technology*, 65, 49–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C. O., & Waterhouse, G. I. N. (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; A FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry*, 131(3), 802–810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.047>

- Suárez-Martínez, S. E., Ferriz-Martínez, R. A., Campos-Vega, R., Elton-Puente, J. E., De La Torre Carbot, K., & García-Gasca, T. (2016). Bean seeds: Leading nutraceutical source for human health. *CYTA - Journal of Food*, *14*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1063548>
- Torres, E., Quishpe, D., Sánchez, A., Cedeño, A., Haro, A., Reyes, M., & González, B. (2014). Caracterización De La Producción De Frijol En La Provincia De Cotopaxi Ecuador: Caso Comuna Panyatug. *Ciencia y Tecnología*, *6*(1), 23–31. <https://doi.org/10.18779/cyt.v6i1.88>
- Vareed, S. K., Reddy, M. K., Schutzki, R. E., & Nair, M. G. (2006). Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits, *78*, 777–784. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.094>
- Vásquez, J. (2018). Desarrollo de formulaciones farmacéuticas microencapsuladas con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes a partir de extractos de la planta *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn., (September), 160–164.
- Veal, E. A., Day, A. M., & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>
- Wu, M. J., O’Doherty, P. J., Fernandez, H. R., Lyons, V., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J. (2011). An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *11*(4), 379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00726.x>
- Yanez, D. (2017). DESARROLLO FENOLÓGICO DEL CULTIVO DEL FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CARGABELLO EN EL CANTÓN BUCAY PROVINCIA DEL GUAYAS., 61. Retrieved from http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25091/1/tesis_025_Ingeniería_Agropecuaria_-_Villalba_Juan_-_cd_025.pdf

ANEXOS

Anexo 1.- Coordenadas cromáticas CIELab del fréjol rojo

Muestra	Réplica	L (Luminosidad)	a* (Componente rojo-verde)	b* (Componente amarillo-azul)
1	1	49,5	39,5	9,1
	2	45,1	39,4	9,6
	3	46,3	34,7	8,2
	4	45,9	37,1	8,5
	5	46	36,8	9,3
	6	45,4	36,7	9,3
	7	46,3	37,5	9,5
	8	46,6	37,2	9,6
	9	45,4	37,5	9,1
	10	44,6	36,3	8,9
2	1	49,5	32,2	9,4
	2	49,4	32,5	9,4
	3	49,1	32,3	9,3
	4	49	32,6	9,2
	5	49,2	32,1	9,1
	6	49,1	32	9,1
	7	50,1	31,9	8,2
	8	50	31,9	8,9
	9	50,2	31,8	8,9
	10	50,2	31,8	9,1
3	1	47,3	39,7	9,9
	2	47,3	39,9	9,9
	3	46,2	40	9,9
	4	48,1	40	9,9

	5	47,2	40	9,8
	6	47,2	39,9	9,8
	7	47,2	39,8	9,7
	8	46,2	39,7	9,6
	9	45,3	39,5	9,6
	10	45,3	39,5	9,7
4	1	49,2	34,3	7,6
	2	49,1	34,2	7,6
	3	49,2	34,1	7,6
	4	49,1	34	7,6

	5	49,1	33,9	7,7
	6	49,2	33,6	7,8
	7	49,3	33,4	7,9
	8	49,3	33,3	7,9
	9	49,5	33,1	8
	10	49,6	33	7,9
5	1	44,2	36,4	9,3
	2	44,7	36,2	9,1
	3	44,9	36	8,9
	4	44,8	35,9	8,8
	5	44,8	35,8	8,7
	6	44,7	35,8	8,6
	7	44,9	35,5	8,6
	8	44,9	35,3	8,5
	9	44,8	35,4	8,5
	10	45	35,1	8,5
6	1	49,4	32,1	10,2
	2	49,4	31,9	10,1
	3	49,5	31,7	10,1
	4	49,4	31,6	10
	5	49,4	31,3	10,2
	6	49,3	31,2	10,1
	7	49,3	31	10,2
	8	49,6	30,8	10,2
	9	49,2	30,7	10,3
	10	49,2	30,5	10,2

7	1	50,4	31,1	8,1
	2	50,5	31,2	8,2
	3	50,5	31,1	8,3
	4	50,2	31,1	8,3
	5	50	31	8,3
	6	50,3	30,9	8,2
	7	50,1	30,7	8,3
	8	50,1	30,5	8,2
	9	50,3	30,5	8,2
	10	50,2	30,4	8,2
8	1	47,7	36,3	8,7
	2	48	36	8,8
	3	47,9	35,7	8,7
	4	47,6	35,4	8,7
	5	47,7	35,2	8,6
	6	47,4	35,1	8,7
	7	47,4	34,7	8,9
	8	47,2	34,3	8,8
	9	47,2	34,1	8,7
	10	47,3	34,1	8,8
9	1	48,5	32	8,9
	2	48,9	31,7	8,8
	3	49,9	31,9	8,8
	4	49,5	32,2	8,7
	5	48,4	32	8,7
	6	48,6	32,1	8,5
	7	48,6	32,1	8,4
	8	49,7	31,9	8,4
	9	49,7	31,9	8,4
	10	49,7	31,9	8,4
10	1	49,9	38,8	10,2
	2	49,2	38,7	10,4
	3	48,8	38,8	10,6
	4	48,7	38,9	10,5
	5	49,1	38,7	10,4
	6	48,7	38,7	10,3
	7	49,1	38,6	10,3

	8	49,3	38,3	10
	9	49,6	37,4	9,7
	10	49,9	38,5	10,4
Promedio		48,2	34,634	9,047
Desviación Estándar		1,81	3,06	0,81

Anexo 2. Determinación del color mediante el sitio Web Encycolorpedia

Encycolorpedia

ac5a65

Buscar



Pintura • Colores web • Colores HTML • Colores nombrados • Ayuda

#ac5a65 código de color hex

AC5A65

172 90 101

El código de color hexadecimal #ac5a65 es una sombra de rosa-rojo. En el modelo de color RGB #ac5a65 dicho color se compone de 67.45% de rojo, 35.29% de verde y 39.61% de azul. En el espacio de color HSL #ac5a65 tiene un tono de 352° (grados), 33% de saturación y 51% de luminosidad. Este color tiene una longitud de onda aproximada de 675.77 nm.



Anexo 3.- Características químicas del fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L)

N° Unidades	pH	° Brix
1	6,17	3
2	6,15	3,1
3	6,16	3,2
4	6,17	3,2
5	6,17	3,1
6	6,16	3
7	6,17	3,2
8	6,15	3,1
9	6,16	3
g10	6,17	3,1

Promedio	6,163	3,1
-----------------	-------	-----

Anexo 4. Datos de la extracción y concentración de antocianinas (Espectrofotometría UV-Vis)

Réplica	Relación	Código	Peso (g)	Abs (nm)	Concentración (mg/100g)	% de Humedad	Sólidos totales	Promedio	
1	1:20	r1	2,507	0,1869	6,50	98,109	1,89	1,79	
2				0,1869	6,50	98,232	1,77		
3				0,1932	6,72	98,298	1,70		
1		t1	r2	2,500	0,1658	5,79	98,132	1,87	1,96
2					0,1790	6,24	98,035	1,97	
3					0,1855	6,47	97,966	2,03	
1		t1	r3	2,5061	0,1747	6,08	98,029	1,97	1,93
2					0,1832	6,38	98,103	1,90	
3					0,1842	6,41	98,068	1,93	
1	1:20	r1	2,5033	0,1799	6,27	97,141	2,86	2,91	
2				0,1920	6,69	97,07	2,93		
3				0,1960	6,83	97,055	2,94		
1		t2	r2	2,5067	0,1851	6,44	98,603	1,40	1,51
2					0,1975	6,87	98,664	1,34	
3					0,1968	6,85	98,196	1,80	
1		t2	r3	2,5024	0,1711	5,96	97,577	2,42	2,46
2					0,1831	6,38	97,557	2,44	
3					0,1851	6,45	97,499	2,50	
1	1:25	r1	2,0001	0,1640	7,15	98,364	1,64	1,73	
2				0,1647	7,18	98,08	1,92		
3				0,1708	7,14	98,361	1,64		
1		t1	r2	2,0188	0,1374	5,94	98,803	1,20	1,20
2					0,1506	6,51	98,832	1,17	
3					0,1468	6,34	98,77	1,23	
1		t1	r3	2,0186	0,1602	6,92	98,535	1,47	1,44
2					0,1631	7,05	98,54	2,46	
3					0,1711	6,92	98,591	2,41	
1	1:25	r1	2,0073	0,1592	7,39	97,833	2,17	2,16	
2				0,1687	7,33	97,833	2,17		
3				0,1649	7,17	97,841	2,16		
1		t2	r2	2,0046	0,1632	7,10	97,839	2,16	2,16
2					0,1748	7,61	97,849	2,15	
3					0,1768	7,70	97,843	2,16	
1					0,1626	7,28	97,569	2,43	

2	r3	2,0035	0,1686	7,34	97,43	2,57	2,48
3	t4		0,1731	7,54	97,564	2,44	

Anexo 5. Análisis de varianza para la concentración de antocianinas de fréjol rojo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: relación	1,5123	1	1,5123	599,21	0,0000
B: tiempo	0,572033	1	0,572033	226,65	0,0000
bloques	0,0184667	2	0,00923333	3,66	0,0817
Error total	0,0176667	7	0,00252381		
Total (corr.)	2,12047	11			

R-cuadrada = 99,1669 por ciento

Concentración de Antocianinas = 3,15667 + 0,142*relación + 0,436667*tiempo

Meta: maximizar Concentración de Antocianinas

Valor óptimo = 7,58

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
relación	20,0	25,0	25,0
tiempo	1,0	2,0	2,0

Anexo 6.- Porcentaje de eficiencia de microencapsulación con las matrices poliméricas (Maltodextrina y la mezcla 50:50 maltodextrina y goma arábica).

Disolvente 1/10	Réplica	Absorbancia (nm)	Concentración (mg/100g)	% Eficiencia de microencapsulación
Agua	Maltodextrina			
	1	0,1291	2,25	70,71
	2	0,1273	2,22	70,53
	3	0,1287	2,24	70,54
	4	0,1296	2,26	71,29
Etanol 96%	1	0,0378	0,66	-
	2	0,0375	0,65	-
	3	0,0379	0,66	-
	4	0,0372	0,65	-

		mezcla 50:50 (Maltodextrina- goma arábica)			
Agua	1	0,2033	3,54	92,52	
	2	0,2067	3,60	92,35	
	3	0,2029	3,54	92,70	
	4	0,2056	3,58	92,51	
Etanol 96%	1	0,0152	0,26	-	
	2	0,0158	0,28	-	
	3	0,0148	0,26	-	
	4	0,0154	0,27	-	

Anexo 7. Análisis de varianza y Prueba de Múltiples Rangos de la eficiencia de microencapsulación

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	946,778	1	946,778	12731,92	0,0000
Intra grupos	0,446175	6	0,0743625		
Total (Corr.)	947,224	7			

Pruebas de Múltiples Rangos

Método: 95,0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Maltodextrina	4	70,7675	x
Maltodextrina y Goma arábica	4	92,525	x

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
Maltodextrina - Maltodextrina y Goma arábica	*	-21,7575

* Indica una diferencia significativa.

Anexo 8.- Análisis de varianza y Prueba de Múltiples rangos para determinar el potencial antioxidante *in vitro* mediante el método DPPH

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	28816,8	1	28816,8	341,72	0,0000
Intra grupos	505,973	6	84,3288		

Total (Corr.)	29322,8	7			
---------------	---------	---	--	--	--

Prueba de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FMAA	4	232,787	x
FMGAA	4	352,822	x

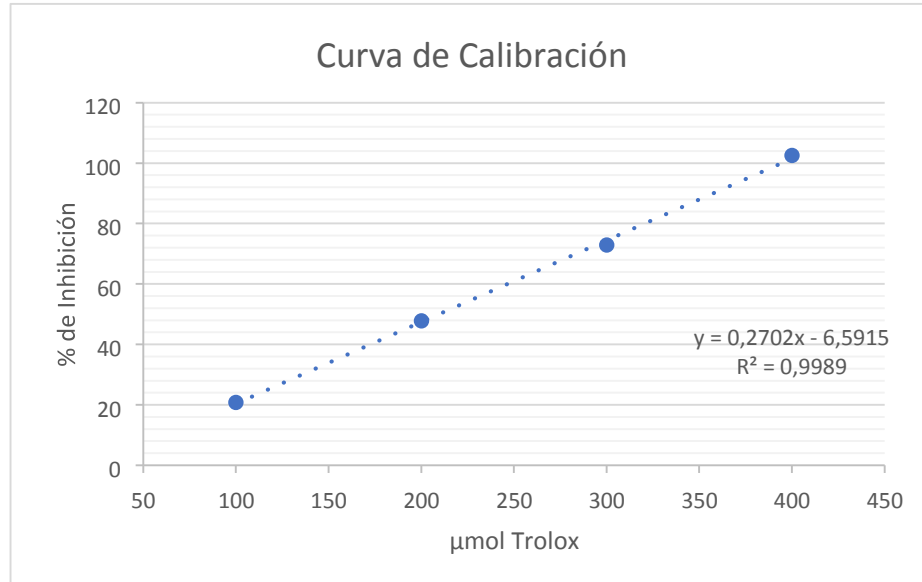
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
FMAA - FMGAA	*	-120,035

* Indica una diferencia significativa.

Anexo 9. Resultados del porcentaje de inhibición DPPH (Método *in vitro*)

Matriz Polimérica	Réplica	Absorbancia	% de Inhibición	μmol equivalente de Trolox/ g microencapsulado
Maltodextrina	1	0,2345	56,45	233,33
	2	0,2410	57,37	236,73
	3	0,2492	58,25	239,98
	4	0,2421	53,15	221,11
Promedio				232,78
Mezcla 50:50 (Maltodextrinagoma arábica)	1	0,1365	89,92	357,20
	2	0,1523	87,09	346,74
	3	0,1444	91,96	364,73
	4	0,1463	85,98	342,62
Promedio				352,82

Anexo 10.-Curva de calibración entre el porcentaje de inhibición vs. μ mol equivalente de Trolox



Anexo 11.- Análisis de varianza para determinar el potencial antiinflamatorio mediante el método de estabilización de membrana de eritrocitos.

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	20748,7	11	1886,25	83,74	0,0000
Intra grupos	540,623	24	22,526		
Total (Corr.)	21289,3	35			