



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



Extracción y microencapsulación de carotenoides de chonta (*Bactris gasipaes*)

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

Autor: Diego Fernando Calle López

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

AMBATO - ECUADOR

Agosto - 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes López Hernández

CERTIFICA

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

Ambato, 17 de Agosto del 2020

.....
PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Diego Fernando Calle López, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Diego Fernando Calle López

C.I. 180421742-8

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para consistencia firman:

.....

Dra. Liliana Cerda

1804148086

.....

Dr. Rubén Vilcacundo

1802738102

.....

MSc. Lic. Danae Fernández Rivero

1757181209

Ambato, 14 de septiembre de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Diego Fernando Calle López

C.I. 180421742-8

AUTOR

DEDICATORIA

A mi madre Amparito

Por apoyarme en toda mi vida y en especial en mi carrera, nunca se lo podré pagar

A mi hermana Ruth

Por estar ahí durante toda mi carrera universitaria y saber que seguiremos juntos

A mi sobrino Dante

Por darme la fuerza para continuar desde que llegó a este mundo

A Sheyla

Porque a pesar de la distancia fue un gran apoyo

A todos aquellos que los perdí en la carrera

Por tantos motivos va dedicados a todos aquellos que iniciamos este camino iguales pero no llegamos a la meta

AGRADECIMIENTOS

A mi madre ya que sin ella no habría llegado a este punto y sin su esfuerzo no habría conseguido nada de lo que tengo.

A mi hermana por todos lo que me enseñó y todo el apoyo que me brindó desde que coincidimos en nuestra vida, nunca le podré pagar todo lo que ha hecho por mí.

Al PhD. Orestes López por su guía y todos los consejos, además por la confianza brindada.

A la PhD. Cristina Arteaga por la confianza puesta en mi persona.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ECUACIONES	xiii

RESUMEN xiv

ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.5 Mecanismo antioxidante	5
1.8. Objetivos	10
1.8.1. Objetivo General	10
1.8.2. Objetivos Específicos.....	10
1.9. Hipótesis	10
1.9.1. Hipótesis Nula.....	10
1.9.2. Hipótesis Alternativa	10
1.10. Variables	10
1.10.1. Variables Dependiente	10
1.10.2. Variable Independiente	10
CAPÍTULO II	11
2. METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales, equipos y reactivos.....	11

2.1.1.	Materiales de laboratorio	11
2.1.2.	Equipos de laboratorio	11
2.1.3.	Reactivos.....	12
2.2.	Metodología	12
2.2.1.	Trabajo de campo.....	12
2.2.2.	Preparación del material vegetal.....	12
2.2.3.	Extracción de carotenoides	12
2.2.4.	Análisis del extracto.....	13
2.2.5.	Análisis Estadístico.....	14
2.2.6.	Microencapsulación del concentrado.....	14
2.2.7.	Eficiencia de microencapsulación.....	15
2.2.8.	Espectrofotometría Infrarroja.....	15
2.2.9.	Análisis del punto de fusión por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	15
2.2.10.	Evaluación de la actividad antioxidante del concentrado microencapsulado <i>in vitro</i>	15
2.2.11.	Evaluación de la actividad antioxidante del concentrado y microencapsulado <i>in vivo</i>	17
CAPÍTULO III.....		18
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1.	Análisis y discusión de resultados	18
3.1.1.	Extracción de carotenoides	18
3.1.2.	Análisis de la eficiencia de microencapsulación.....	20
3.1.3.	Análisis por espectrofotometría infrarroja FT-IR.....	21
3.1.5.	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del microencapsulado	25
3.1.6.	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> del microencapsulado	27
3.1.7.	Comprobación de la hipótesis.....	30
CAPÍTULO IV.....		31
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
4.1.	Conclusiones.....	31
4.2.	Recomendaciones	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Bactris gasipaes</i>	4
Tabla 2. Análisis de Varianza para Carotenoides extraídos de Chonta	18
Tabla 3. Respuesta Óptima	18
Tabla 4. Porcentaje de eficiencia de microencapsulación (% EM).....	21
Tabla 5. Resultados de inhibición por DPPH	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Pareto de extracción de carotenoides de chonta.....	19
Figura 2. Superficie de respuesta Tiempo Relación MV/disolvente.....	19
Figura 3. Superficie de respuesta Relación MV/disolvente y madurez	20
Figura 4. Espectro infrarrojo de. A) Concentrado de carotenoides; B) Carotenoides microencapsulados; C) Mezcla polimérica	22
Figura 5. Termogramas de la calorimetría diferencial de barrido de. A) Concentrado de carotenoides; B) Carotenoides microencapsulados; C) Mezcla polimérica.....	24
Figura 6. Curva de calibración trolox	26
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> frente a un estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂ 3 mmol ⁻¹	28
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> frente a un estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂ 3 mmol ⁻¹ y protección con vitamina C y el microencapsulado de carotenoides de chonta	29

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación de sólidos totales.....	13
Ecuación 2. Concentración de carotenoides.....	13
Ecuación 3. Masa de sólidos extraídos.	14
Ecuación 4. Masa de carotenoides en cien gramos de solidos extraídos.	14
Ecuación 5. Eficiencia de microencapsulación.....	15
Ecuación 6. Porcentaje de inhibición de DPPH	16

RESUMEN

La chonta es una fruta tradicional que es consumida en la región amazónica de Latinoamérica y tiene compuestos que le brindan capacidad antioxidante, los carotenoides que contiene lo dotan de un alto valor en la dieta humana, por ello este trabajo se enfocó en extraer estos compuestos y colocarlos en una presentación adecuada para su utilización en la industria como lo es el caso de las microencapsulación. La extracción se realizó con un diseño experimental de dos niveles con tres factores, con los factores de madurez, tiempo y proporción material vegetal:etanol (96 por ciento) obteniéndose que las condiciones óptimas fueron de 100 por ciento de madurez, con 60 minutos y una proporción 1:70 a temperatura de 70 grados Celsius, este extracto se microencapsuló con una mezcla de maltodextrina y goma arábiga mediante secado por aspersión. Se evaluó la eficiencia de microencapsulación obteniéndose 98,90 por ciento, también se obtuvieron los termogramas y los espectros infrarrojos donde se corroboró la eficiencia de microencapsulación. Mientras la actividad antioxidante se evaluó *in vitro* mediante el método DPPH obteniéndose 69,19 micromol sobre litro en el extracto y 59,30 micromol sobre litro en el microencapsulado de equivalente de trolox, y en la prueba *in vivo* se aplicó estrés oxidativo mediante peróxido de hidrógeno a *Saccharomyces cerevisiae* y se protegió con el microencapsulado, evidenciándose su poder antioxidante frente a patrones de vitamina C.

Palabras claves: Microencapsulación, carotenoides, capacidad antioxidante, chonta.

ABSTRACT

Chonta is a traditional fruit that is consumed in the Amazon region of Latin America and has compounds that give it antioxidant capacity, the carotenoids it contains give it a high value in the human diet, therefore this work focused on extracting these compounds and place them in a suitable presentation for use in industry, such as microencapsulation. The extraction was carried out with an experimental design of two levels and three factors, with the factors of maturity, time and proportion of plant material:ethanol (96 percent), obtaining that the optimal conditions were 100 percent maturity, with 60 minutes and a 1:70 proportion at temperature of 70 Celsius degrees, this extract was microencapsulated with a mixture of maltodextrin and arabig gum by spray drying. The microencapsulation efficiency was evaluated obtaining 98.90 percent, thermograms and infrared spectra were also obtained where the microencapsulation efficiency was corroborated. While the antioxidant activity was evaluated *in vitro* using the DPPH method, obtaining 69.19 micromol per liter in the extract and 59.30 micromol per liter in microencapsulated of trolox equivalent, and in the *in vivo* test, oxidative stress was applied by peroxide of hydrogen to *Saccharomyces cerevisiae* and was protected with microencapsulation, showing its antioxidant power against vitamin C standards.

Keywords: Microencapsulation, carotenoids, antioxidant capacity, chonta.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

Metabolitos en plantas

Las plantas al ser organismos autótrofos tienen un metabolismo que produce varias sustancias en su interior, pudiendo ser primarios o secundarios según la función que cumplen, (Ávalos, 2010).

Aprovechar estos compuestos naturales abre la puerta a tratamientos de enfermedades o dolencias por las propiedades que presentan los metabolitos, entre ellas se encuentran antiinflamatorias, antioxidantes, aromáticas, antibacterianas entre otras.

Estas propiedades se pueden deducir gracias a los conocimientos ancestrales, los cuales con experiencias de varias generaciones se han utilizado para varios fines y con evaluar científicamente una planta o parte de ella se puede identificar un metabolito que funciona como principio activo y así aislarlo para producción industrial.

Metabolitos primarios

Son aquellos metabolitos que participan en los procesos vitales del ciclo de vida de la planta, como fotosíntesis, reproducción celular, captación de nutrientes, respiración vegetal, producción de proteínas, transaminación, etc, entre ellos se encuentran:

Carbohidratos

ADN y ARN

Proteínas

Lípidos

Clorofila

Metabolitos secundarios

Aquellos que no interfieren en un proceso vital pero tienen funciones importantes como atraer insectos para polinización, alejar plagas, esparcir sus semillas, protección frente a

amenazas, aquí se puede obtener una mayor variedad de compuestos con distintas propiedades ya que un compuesto puede tener una función biológica en la planta pero al ser consumida o utilizada puede tener otros efectos.

Entre ellos se encuentran

Carotenoides

Ceras

Terpenos

Esteroides

Alcaloides

Flavonoides

Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos esenciales en el organismo para evitar daño oxidativo y así mantener una buena salud, además de prevenir el envejecimiento y otros problemas de salud, al actuar eliminando los radicales libres con una reacciones para evitar la interacción con el oxígeno, produciéndose un menor estrés oxidativo (Boveris, 2002), si bien el organismo tiene un balance redox, este puede verse afectado por varios aspectos, tanto exógenos como endógenos, por lo que el consumo de antioxidantes de fuentes externas es indispensable para que el cuerpo se mantenga saludable (Coronado H et al., 2015)

Los antioxidantes se encuentran en frutas, hortalizas y vegetales en general, especialmente como vitamina E, vitamina C y carotenoides, encontrado en alimentos con colores fuertes rojizos, naranjas, etc., ejemplos de estos alimentos son zanahoria, tomates, alfalfa, naranja, y chonta (Mattivi, 2002), que aunque es un alimento usado en varias regiones de Sudamérica y tiene varios estudios (Martínez Girón et al., 2019), no es usada a nivel industrial o farmacéutico, por lo que es importante su análisis en específico sobre su actividad antioxidante, (Carranco et al., 2011).

Si bien muchos alimentos pueden conseguirse de manera fácil, su conservación y utilización no siempre es la adecuada, ya que se degradan rápido o requieren

preparaciones poco prácticas para poder consumirlos, por ello es importante explorar otros métodos como microencapsulación para aumentar su conservación y disponibilidad, (Avendaño Prieto & Acevedo Buitrago, 2015).

Carotenoides

Compuestos liposolubles que se producen en plantas y algas, que les sirven como pigmentos naturales, responsables de los colores rojo, amarillo y naranja de frutas y flores.

Se dividen en carotenos y xantofilas.

Caroteno.- hidrocarburos insaturados sin oxígeno en su estructura entre ellos:

Betacaroteno

Licopeno

Xantofilas.- hidrocarburos insaturados con uno o más átomos de oxígeno en su estructura, entre ellos:

Luteína

Zeaxantina

Su función biológica en los organismos que los consumen es de antioxidante, previniendo enfermedades degenerativas.

En la industria se utilizan como colorantes naturales en especial en alimentos procesados.

Plantas autóctonas

Las plantas que son originarias de una región se denominan autóctonas y constituyen la biodiversidad de dicha región.

Varias de ellas tienen diversos usos por la población local en las que se han convertido parte de su dieta o constituyen su medicina tradicional.

Bactris gasipaes

Bactris gasipaes pertenece a la familia Palmae, subfamilia Arecoideae, y tribu Cocoseae,

es llamado chonta o chontaduro como nombre común en Ecuador, en otros países difiere su nombre, está presente en Sudamérica principalmente en países con selva amazónica como Venezuela, Colombia, Brasil (Roeland, 2003).

Esta especie es originaria de la Amazonía, cultivada por las poblaciones de este sector como alimento, usándose su fruto y su tallo para diversas preparaciones (Mora-Urpí et al., 2004),

Florece luego de 4 o 5 años de haber sido sembrada, el fruto se forma en un eje central con ramas alrededor, con forma de drupa de entre 7-10 centímetros de diámetro, de color rojo, con consistencia fibrosa y una semilla interior, el color se intensifica al llegar a la madurez, aumentando de esta manera el contenido de carotenoides, (Zarin, 2004).

Taxonomía

TABLA 1. TAXONOMÍA DE BACTRIS GASIPAES

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Arecales
Familia	Arecaceae
Género	Bactris
Especie	gasipaes

1.2 Composición química de *B. gasipaes*

El fruto de *B. gasipaes* tiene varios compuestos beneficiosos, entre los cuales se encuentran 56 g de agua, 3 g de proteína, 6 g de grasa, 33 g de carbohidratos, 1 g de fibra, 1 g de ceniza, 0,5 g de vitaminas y 1,5 mg de carotenos por cada 100 g de mesocarpio (Martínez, 2011), difiriendo de las distintas variedades y terreno en el que crecen (Johnson, 2007).

1.3 Equilibrio oxidativo

La generación de energía en el cuerpo de los seres vivos, principalmente usa como fuente al oxígeno mediante la respiración o la fotosíntesis, este proceso conlleva a producir radicales libres por la interacción con esta molécula, esto lleva a una acumulación de especies radicales de oxígeno, lo cual es afrontado por compuestos antioxidantes, esto se conoce como equilibrio oxidativo, lo que es necesario para un correcto funcionamiento de las actividades vitales del organismo (Avello & Suwalsky, 2006).

1.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo viene dado por un equilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes, este equilibrio se rompe por la acumulación de sustancias oxidantes, generándose varios cambios en los organismos vivos, con un daño oxidativo por la naturaleza de este aumento, (Camps & Ruffino, 2010).

Las sustancias oxidantes se conocen como especies reactivas de oxígeno o radicales libres, debido a que mantienen un número impar de electrones en su última capa, lo que genera una interacción química con las moléculas celulares extrayendo un electrón y ocasionando que estas últimas quedan inestables por perder la paridad electrónica, ocasionando el estrés oxidativo (Viada et al., 2017).

Ejemplos de radicales libres son, anión peróxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, mientras ejemplos de antioxidantes se pueden encontrar en: antocianidinas, catequinas, citoflavonoides, betacarotenos, vitamina C, entre otros, los cuales se encuentran principalmente en fuentes vegetales, como zanahorias, cítricos, plantas medicinales, (Coronado H et al., 2015).

El estrés oxidativo genera el envejecimiento, la aparición de ciertos cánceres y otras patologías asociadas.

1.5 Mecanismo antioxidante

Los antioxidantes actúan de dos formas, la primera es cediendo un electrón al radical libre y así reduciéndolo, formando una molécula no toxica, mientras el antioxidante queda transformado en un radical débil, mucho menos peligroso que el primero. El otro

mecanismo es enzimático, que catalizan reacciones que usan el sustrato que es utilizado por los radicales libres y de esta manera no realizan su reacción natural y daña al sistema (Cruz Neyra, 2018).

Existen distintos tipos de antioxidantes, exógenos que ingresan por la dieta, endógenos que se producen dentro del cuerpo, además de la clasificación anterior en enzimáticos y no enzimáticos (Mayor, 2010).

El papel de estas sustancias es vital en la prevención de cáncer, reducción de la tasa de envejecimiento y en general el cuidado de la salud.

1.6 Factores que influyen extracción y estabilidad de los carotenoides

Temperatura

El aplicar altas temperaturas a una matriz que contiene carotenoides provoca que los isómeros *trans* se transformen en *cis* y con ello la disminución de actividad antioxidante, por lo que es importante controlar el tiempo de exposición en la extracción de la fuente vegetal para así no perder esta actividad propia del compuesto (Melendez et al., 2004).

Disolvente

La naturaleza de los carotenoides los hace liposolubles, diluyéndose en disolventes orgánicos como etanol, benceno, cloroformo, etc., lo que facilita la evaporación de estos compuestos y así una mayor concentración de producto, llegando al punto de obtener carotenoides cristalizados, además permiten trabajar con temperaturas bajas de evaporación y así proteger a los carotenoides, (Primo Yúfera, 2007).

Luz

Los carotenoides están formados por isoprenos, que vienen de isopentenil pirofosfato, proporcionando varios dobles enlaces conjugados y ramificaciones de metilos, entre mayor cantidad de dobles enlaces conjugados, el color será más rojizo, además son sensibles a la luz, por lo que deben estar almacenados en recipientes que no permitan la entrada de radiación visible, lo que podría destruir estos enlaces conjugados, (Rodríguez Rivera & Simón Magro, 2008).

1.7. Microencapsulación

Una micropartícula se forma con una mezcla de polímeros y compuesto activo, tomando la estructura de microcápsula o microesfera, el polímero que generalmente es maltodextrina y goma arábica y funcionan como protección para el compuesto, además se puede controlar el tamaño de partícula, la concentración, el contenido de humedad, lo que permite usar diferentes formulaciones para la industria, (Pastuña-Pullutasig et al., 2016).

Tipos de microencapsulación

Se pueden usar distintos mecanismos para obtener las micropartículas, siendo de naturaleza física y química.

Cada uno produce partículas con distintos materiales y depende del objetivo buscado y las propiedades del metabolito a encapsular elegir el método apropiado.

Microencapsulación por medios químicos

Usan la reacción con compuestos químicos e interacciones físico-químicas para obtener las partículas.

Entre ellos se encuentran

Coacervación

Co cristalización

Polimeración interfacial

Gelificación iónica

Inclusión molecular.

Microencapsulación por medios físicos

Usan la interacción del calor y frío para evaporar el disolvente y secar las partículas.

Se encuentran:

Secado por aspersión

Secado por congelamiento

Extrusión

Soluciones para encapsular

Según la naturaleza del metabolito está puede originar distintos tipos de mezclas que darán resultados diferentes al momento de la microencapsulación

Se pueden originar soluciones y suspensiones.

Soluciones:

Cuando el metabolito se disuelve por completo en agua, al encapsular se generan microesferas

Suspensiones

Cuando se forman dos capas una del metabolito y otra de agua, ocurre especialmente en aceites, la encapsulación da lugar a la formación de microcápsulas

Estructuras formadas por microencapsulación

Las principales estructuras que se forman son las microesferas, microcápsulas y liposomas.

Microesferas

La sustancia a encapsular se encuentra mezclada con el polímero y se encuentra en toda la estructura tanto en el interior como en la superficie

Microcápsulas

Se forma en el centro una acumulación del metabolito que es protegida por el polímero

Liposomas

La menos común de todas las Formas, similar a las microcápsulas pero el material protector es una capa típica.

Importancia de la microencapsulación

Es un método ampliamente utilizado en la industria, ya que permite conservar por mucho tiempo sin alteración compuestos en forma sólida, además de su fácil aplicación en formulaciones, preserva aceites esenciales, enmascara olores, protege de la oxidación, entre otros beneficios a los compuestos encapsulados, (Finch & Bodmeier, 2000).

Ventajas

Preserva el metabolito por más tiempo ya que lo protege de factores como humedad, luz, calor, oxígeno, contaminantes, microorganismos.

Facilita la incorporación en preparaciones al ser en presentación de polvo se puede cuantificar de manera más sencilla y así su utilización es más precisa y práctica.

Facilita el transporte, al ser sólido permite almacenar grandes volúmenes sin el riesgo de fugas o derramamientos.

Mantiene la actividad del metabolito, en la que la reducción de la actividad es mínima luego del proceso y permanece constante por mucho tiempo más que en estado natural o extraído.

Permite conservar propiedades de plantaciones estacionales, al tener sólo una temporada al año de cosecha de cierta materia prima permiten conservar los metabolitos de estos para poder ser usados durante todo el año.

Desventajas

No todos los disolventes pueden ser reutilizados.

Conlleva el uso de equipos costosos y de gran costo.

Requiere de personal cualificado para realizar el proceso.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo General

Extraer, microencapsular y evaluar la actividad antioxidante de los compuestos liposolubles presentes en el fruto de chonta (*Bactris gasipaes*)

1.8.2. Objetivos Específicos

- Determinar los parámetros óptimos de extracción de compuestos liposolubles de *Bactris gasipaes* mediante la aplicación de un diseño experimental.
- Microencapsular los compuestos liposolubles extraídos de *Bactris gasipaes*.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y parámetros fisicoquímicos del producto microencapsulado.

1.9. Hipótesis

La microencapsulación de compuestos liposolubles de concentrado de *B. gasipaes* influye en la actividad antioxidante del extracto.

1.9.1. Hipótesis Nula

La microencapsulación de compuestos liposolubles de concentrado de *B. gasipaes* no influye en la actividad antioxidante del extracto.

1.9.2. Hipótesis Alternativa

La microencapsulación de compuestos liposolubles de concentrado de *B. gasipaes* si tiene influencia en la actividad antioxidante del extracto.

1.10. Variables

1.10.1. Variables Dependiente

Capacidad antioxidante del extracto puro y Microencapsulado de *B. gasipaes*.

1.10.2. Variable Independiente

Tiempo de extracción, concentración de material vegetal, madurez del fruto.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales, equipos y reactivos

2.1.1. Materiales de laboratorio

Los materiales usados en el presente trabajo fueron: matraz Erlenmeyer de 250 ml, probetas de 10, 50 y 100 ml, pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml, micropipetas y puntas estériles de 2 a 20 μ l y 10 a 1000 μ l, placa de poliestireno con 96 pocillos, cubeta de plástico para espectrofotómetro, botellas de vidrio ámbar de 60 ml y 1000 ml, tubos para centrífuga de 50 ml, termómetro de mercurio, varillas de agitación, y otros materiales menores.

2.1.2. Equipos de laboratorio

Se usó para la etapa de secado un secador de bandejas vertical (Gander CD-160), para el triturado de la materia vegetal seca se usó un molino de granos manual. En la extracción con etanol de carotenoides de la chonta se requirió de una balanza analítica (Ohrus PA-313), para tomar el material vegetal seco y plancha de calentamiento magnética (Corning PC-620D) para calentarlo con etanol., para eliminar los residuos vegetales se usó una centrífuga (Rotina 380), para determinar la humedad de las muestras para elegir la mejor combinación de factores se usó una balanza de humedad (MCR MB50) y un espectrofotómetro (Fisher Scientific AccuScan Go), para aumentar la escala de extracción se usó un electroagitador (Fisher Scientific 14-500-215), además de la centrífuga y una refrigeradora (Indurama) para mantener conservada el extracto, para concentrar los carotenoides se usó un rotoevaporador (IKA 8) y para microencapsular un spray dryer (Buchi B-290), para los análisis posteriores se necesitó una cámara de flujo laminar (ESCO OPTIMAR) y el espectrofotómetro como equipos más relevantes, mientras para el espectro infrarrojo se usó el equipo FTIR de la Escuela Politécnica de Chimborazo y el analizador Infrarrojo para el análisis del mismo nombre.

2.1.3. Reactivos

Se usaron los siguientes reactivos para el proceso:

Extracción.- etanol 90 %.

Microencapsulación.- agua destilada, goma arábica, maltodextrina.

Actividad antioxidante in vitro.- metanol 70 %, agua destilada, etanol 90 %, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazilo) y trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

Actividad antioxidante in vivo.- vitamina C 500 mg/ml (Bayer), peróxido de hidrógeno comercial, medio YPD, buffer PBS, agua destilada.

2.2. Metodología

2.2.1. Trabajo de campo

Se utilizaron 2 cabezas de chonta en estado maduro y 80 % de madurez, recolectados en el mercado de la ciudad del Puyo (1°29'1.3" S 78°0'9.3" O), en el cantón Pastaza, provincia de Pastaza.

Se llevaron a Ambato envuelto en papel periódico y llevadas al laboratorio de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología para su procesamiento.

2.2.2. Preparación del material vegetal

Se cortará en trozos a todas las bajas, se desechará la semilla y se colocará en un secador de bandeja GANDER_{MTN} a 60 °C por un periodo de 72 horas. Luego que esté seco el material vegetal se molerá en un molino de piedra para obtener un polvo (Davies, 2015), esto protege a los compuestos dentro de la chonta, se almacenará en un funda plástica en un lugar fresco y seco.

2.2.3. Extracción de carotenoides

Se estudió el proceso de extracción sólido-líquido, empleando etanol como disolvente, teniendo en cuenta las siguientes variables de entrada del diseño experimental:

Factor A: relación material vegetal:etanol Nivel (-1) 1:70 y Nivel (+1) 1:80.

Factor B: tiempo Nivel (-1) 30 min y Nivel (+1) 60 min.

Factor C: madurez Nivel (-1) 90 % y Nivel (+1) 100 %.

Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento, con un total de 24 tratamientos.

Cada análisis se realizó con 50 ml de etanol al 96 % y se usó las siguientes cantidades de material vegetal pulverizado:

Proporción 1:70: 0,714 g

Proporción 1:80: 0,625 g

Luego se procedió a aplicar el tratamiento térmico durante los tiempos correspondientes en una plancha de calentamiento (Corning PC-620D) a 70 °C y agitación magnética a 200 min⁻¹, se realizó tres réplicas de cada experimento.

Luego del tiempo de cada experimento se dejó enfriar y se centrifugó a 3000 min⁻¹ por 10 min y se obtuvo el sobrenadante y desechando el material vegetal precipitado, (Cardona et al., 2006) y se almacenó en botellas ámbar y en refrigeración.

2.2.4. Análisis del extracto

La determinación de sólidos totales (SST) se realizó con la diferencia del porcentaje de humedad con el total del extracto con la ecuación 1:

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

ECUACIÓN 1. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES.

*SST: sólidos totales

% humedad: cantidad de humedad del extracto

El porcentaje de humedad se analizó con una balanza de humedad (KERN MLS 50-3), de cada experimento.

Para determinar el contenido de carotenoides en el extracto se midió la absorbancia a 515 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO) y se usó la ecuación 2 para calcular la concentración de carotenoides, (Calderón & Vera, 2018).

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

ECUACIÓN 2. CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES.

*A: Absorbancia del extracto a 515 nm

E: absortividad de los carotenoides 3950 cm⁻¹M⁻¹

C: concentración de carotenoides mg/l

Se usó la ecuación 3 para calcular la masa de sólidos extraídos

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

ECUACIÓN 3. MASA DE SÓLIDOS EXTRAÍDOS.

*SST: sólidos totales g

M: Masa inicial del material vegetal g

Con la ecuación 4 se determinó la masa total de carotenoides en 100 g de sólidos extraídos.

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

ECUACIÓN 4. MASA DE CAROTENOIDES EN CIEN GRAMOS DE SOLIDOS EXTRAÍDOS.

*MSE: masa de sólidos extraídos g

mc: masa de carotenoides en 100 g

mg: masa de carotenoides en volumen final (en 50 ml)

2.2.5. Análisis Estadístico

Se analizó la mejor relación entre porcentaje de madurez, concentración de material vegetal y tiempo de extracción con relación a la eficiencia de extracción con el programa Statgraphic Centurión 16.1 con un diseño 2^3 , con 3 factores y dos niveles (Mate Jiménez & Oriol Hoyos, 2011), con los valores de absorbancia obtenidos, con el diseño detallado en la sección 2.2.3.

2.2.6. Microencapsulación del concentrado

El resultado del análisis estadístico, se escaló hasta extraer 10 litros, para concentrarlo en un rotoevaporador para eliminar el etanol, proceso que se realizó a 68 °C.

Luego de obtener el concentrado, se preparó una emulsión con maltodextrina y goma arábica, en proporción 50:50:50, se usó un homogeneizador de alta velocidad a 2000 min^{-1} durante 10 minutos para obtener una emulsión con un elevado grado de dispersión.

Se usó un mini spray dryer (Buchi – B290) para la microencapsulación con las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada: 150 °C
- Temperatura de salida: 90 °C
- Flujo de aire de secado: 100 %
- Flujo de aire de atomización: 500 l/h

El producto obtenido se almacenó en una funda resellable zipper, para evitar la entrada de humedad (Juscamaita Fabián et al., 2017).

2.2.7. Eficiencia de microencapsulación

Se realizó una disolución 1:10 en agua y otra en etanol (96 %), luego de determinó la concentración en ambos disolventes mediante absorbancia a 515 nm y se determinó el porcentaje de microencapsulación con diferencia entre ambos disolventes:

$$\%EM = \frac{Conc. H_2O - Conc. EtOH}{Conc. H_2O} * 100 \%$$

ECUACIÓN 5. EFICIENCIA DE MICROENCAPSULACIÓN

Conc. EtOH: concentración de carotenoides en etanol

Conc. H₂O: concentración de carotenoides en agua

%EM: porcentaje de eficiencia de microencapsulación

2.2.8. Espectrofotometría Infrarroja

Se prepararon muestras del concentrado, el Microencapsulado y la mezcla de polímeros, y cada uno se analizó su % de transmitancia en un intervalo de 4360 cm⁻¹ a 760 cm⁻¹ en un equipo de análisis de infrarrojo, con ello se compararon los espectros obtenidos ("FTIR Spectroscopy", 2016), esto se realizó en El laboratorio de química instrumental de la Facultad de Ciencias (ESPOCH).

2.2.9. Análisis del punto de fusión por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Al igual que en el análisis FT-IR, se realizó el análisis en un calorímetro DSC, las muestras del concentrado, el Microencapsulado y la mezcla de polímeros.

Luego de obtener los termogramas, estos se compararon identificando el pico correspondiente a la temperatura de fusión del licopeno (Radomski, 2013).

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

Para obtener mediciones de la actividad antioxidante del Microencapsulado, se realizó

una curva con Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), con 500×10^{-6} mol/l, lo que se traduce en 0,0129 g de trolox en 50 ml de etanol 96 % y 50 ml de agua destilada, posteriormente se realizó diluciones para obtener concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500×10^{-6} mol/l, estas soluciones se protegieron de la luz y del calor.

Se preparó también una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el cual actúa degradándose con el oxígeno y según la acción protectora del Microencapsulado, extracto y trolox determinará la acción antioxidante. Se usó 0,0059 g de DPPH, disueltos en una solución de 80 ml de metanol y 20 ml de agua, para alcanzar una concentración de 150×10^{-6} mol/l, de igual manera se mantiene en temperatura baja y alejada de la luz.

Se realizó una dilución 1/200 del Microencapsulado y del concentrado en agua:etanol 50:50, luego se colocó 20 μ l de la dilución de Microencapsulado, concentrado y los patrones de trolox en una placa de 96 pocillos, luego se colocó 180 μ l de DPPH en cada pocillo con las soluciones, la bandeja se introdujo en el espectrofotómetro con un programa de 40 minutos y se midió la absorbancia a 515 nm.

Luego se determinará el porcentaje de inhibición con la ecuación 6 (Milardovic et al., 2005).

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

ECUACIÓN 6. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE DPPH

*Am: absorbancia de Microencapsulado

Ab: absorbancia del blanco

Ac: absorbancia del control

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

Se utilizó el análisis de estrés de microorganismos para estudiar la actividad *in vivo*, para ello se usó *Saccharomyces cerevisiae*, como microorganismo modelo.

Se inició con levadura comercial que se inoculó en 200 ml de medio YPD, luego se aisló colonias del medio inicial en placas durante 72 horas a 28 °C. Aislado la cepa, se inoculó en 5 ml de YPD durante 6 horas a 28 °C y agitación mediante shaker.

Se realizó también dos diluciones de Microencapsulado 25 y 50 mg/ml, dos de vitamina C de 25 y 50 mg/ml.

Teniendo ya el cultivo se realizó una dilución 1/10 del mismo y se inoculó 5 µl en 3 ml de YPD y se agregó 1 ml de la solución de Microencapsulado y vitamina C respectivamente, se dejó incubando 18 horas a 28 °C, además de 5 µl de cultivo en 4 ml de YPD.

El control positivo será la vitamina C, mientras que el control negativo será el cultivo con la levadura sin ningún tratamiento antioxidante.

Se centrifugó cada solución a 2700 min⁻¹ por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se re suspendió en 3 ml de PBS pH 7,3, luego se ajustó la absorbancia (600 nm) de cada solución hasta 0,1 de cada solución con PBS.

Previo al estrés a las soluciones se preparó soluciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 3 y 0,5 mmol⁻¹.

Se agregó 1 ml de cada solución de peróxido a las soluciones con PBS, y se dejó incubar por 60 minutos a 28 °C, se centrifugó de nuevo.

Por último se re suspendió el precipitado en medio YPD, y se inoculó 250 µl de cada tratamiento en una placa de 96 pocillos, esto se hizo por precipitado.

Se colocó la placa en el espectrofotómetro y se midió cada 20 minutos durante 20 horas el crecimiento mediante absorbancia a 600 nm y 30 °C.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Extracción de carotenoides

A continuación se muestra el análisis de varianzas para el proceso de extracción de los carotenoides en las diferentes condiciones estudiadas.

TABLA 2. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CAROTENOIDES EXTRAÍDOS DE CHONTA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Proporción	0,00996338	1	0,00996338	0,10	0,7499
C:Madurez	134,129	1	134,129	1410,09	0,0000
AC	0,593147	1	0,593147	6,24	0,0224
bloques	0,399289	2	0,199645	2,10	0,1516
Error total	1,71218	18	0,0951209		
Total (corr.)	136,843	23			

Al realizar el análisis de varianza, se obtuvo que la madurez fue el factor que más influyó, con un valor de F de 1410,09, seguido de la interacción de proporción y madurez y por último la proporción MV:etanol, esto indica que antes de iniciar el proceso de extracción es necesario obtener frutos con madurez fisiológica. El factor tiempo, no tuvo influencia en el intervalo estudiado sobre la concentración de carotenoides extraídos.

En la tabla 4 se muestran los valores de la respuesta óptima de los parámetros estudiados en el proceso de extracción

TABLA 3. RESPUESTA ÓPTIMA

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Relación	70,0	80,0	70,0
Tiempo	30,0	60,0	60,0
Madurez	90,0	100,0	100,0

Como se puede apreciar, el tratamiento óptimo para extracción de chonta será con el material vegetal que tenga 100 % de madurez, con una relación material vegetal:etanol de

1:70 y con 60 minutos en la extracción.

De igual manera se puede apreciar en el diagrama de Pareto en el que se observó la relación mencionada en el análisis de ANOVA y se presenta a continuación en la figura 1.

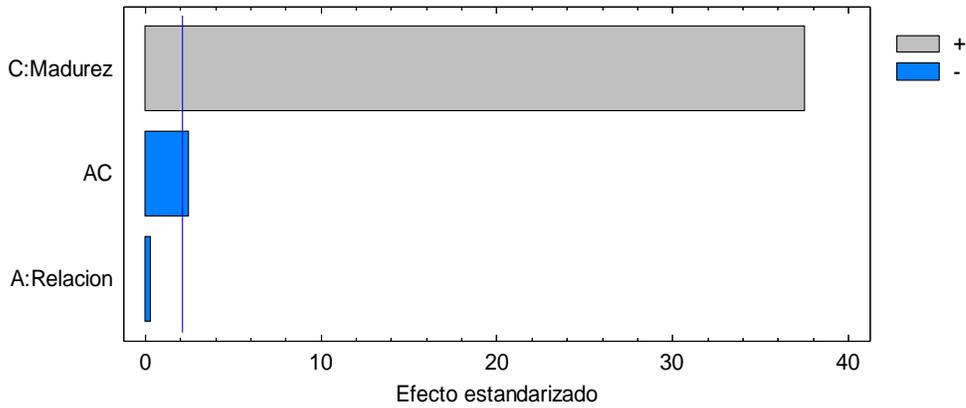


FIGURA 1. DIAGRAMA DE PARETO DE EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES DE CHONTA.

Se observa que la madurez tiene el mayor impacto sobre la extracción de carotenoides, con esto se determinó que al llegar al punto de mayor madurez fisiológica, el contenido de carotenoides será máximo, y los otros factores como concentración de material vegetal y tiempo de extracción no tienen influencia significativa en el intervalo estudiado, pero si la interacción entre la relación MV/disolvente y madurez, siendo lo segundo que influye en el proceso de extracción.

Seguidamente en la figura 2 se muestra el diagrama de superficie de respuesta para la relación MV/disolvente y el tiempo.

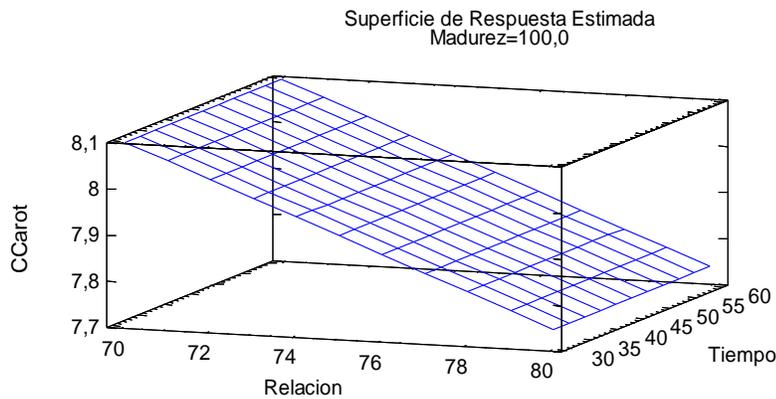


FIGURA 2. SUPERFICIE DE RESPUESTA TIEMPO RELACIÓN MV/DISOLVENTE

En la figura 2 se pudo observar que la mayor obtención de carotenoides se alcanzó con la relación 1:70, mientras que la diferencia entre tiempos (30 y 60 min) fue imperceptible, sin embargo el análisis de optimización recomienda el máximo valor de tiempo.

En la figura 3 se muestra el diagrama de superficie de respuesta para la relación MV/disolvente y la madurez.

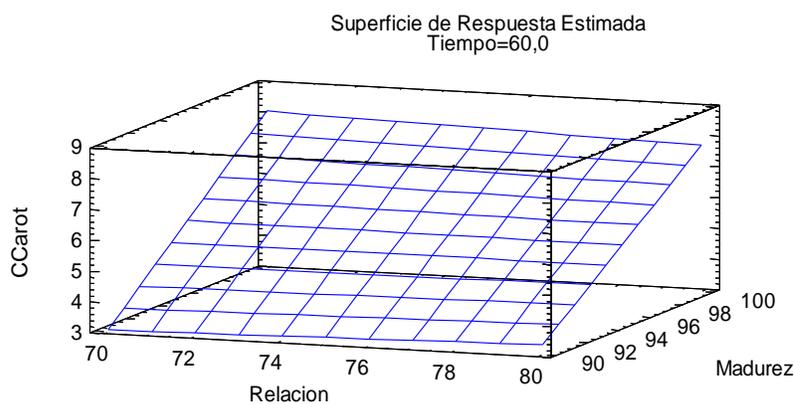


FIGURA 3. SUPERFICIE DE RESPUESTA RELACIÓN MV/DISOLVENTE Y MADUREZ

En la figura 3 se observó que la mayor concentración de carotenoides se alcanza con el 100 % de madurez y una relación 1:70, lo que coincide exactamente con el análisis de optimización, indicando de esta forma que en el fruto maduro se cuenta con la mayor cantidad de carotenoides asociados a su madurez fisiológica, dándole el color característico (rojo) al fruto.

3.1.2. Análisis de la eficiencia de microencapsulación

El proceso de microencapsulación se realizó en un mini Spray Dryer donde después de extraer en las condiciones (60 min, 1:70, 100 % madurez) y concentrar para evaporar el disolvente, se realizó una emulsión de estos carotenoides concentrados en una solución de agua y los polímero goma arábica y maltodextrina en una proporción 1:1:1 Extracto: Goma arábica: maltodextrina. Posterior a la mezcla se llevó al mini spray dryer para realizar la evaporación del agua y la consiguiente formación de las microcápsulas de carotenoides de chonta. En la tabla 5 se muestran los valores de eficiencia de microencapsulación.

TABLA 4. PORCENTAJE DE EFICIENCIA DE MICROENCAPSULACIÓN (% EM).

Dilución 1:100	Absorbancia	Concentración mg/L	% E.M.
Etanol	0,75	1,92 ± 0,01	98,90 ± 0,02
Agua	68,77	174,10 ± 0,03	

Se realizó una dilución 1:100 del microencapsulado para analizar la eficiencia del proceso de microencapsulación, en la que se usó agua y etanol como disolventes y luego se midió su absorbancia, con esto se pudo contrastar cual fue el contenido de carotenoides que se quedaron en la superficie de la micropartícula y aquel que se encuentra en el interior, con la relación entre el contenido disuelto en un compuesto que sea soluble y en otro insoluble (agua y etanol respectivamente). Como resultado se obtuvo una eficiencia de microencapsulación de 98,90 %, superior al 94,80 % alcanzado por Guevara (2020) y al 96,21 % obtenido por Fiallos (2019) de carotenoides microencapsulados, indicando que la mezcla polimérica entre goma arábica y maltodextrina es adecuado para obtener micropartículas con alta eficiencia y por ende protección para los carotenoides.

3.1.3. Análisis por espectrofotometría infrarroja FT-IR

Este análisis se realizó en el intervalo entre 4180 y 580 cm^{-1} en el que el barrido dio los picos característicos de los compuestos, indicando también que los picos que se oculten en el microencapsulado significa que el compuesto efectivamente se encuentra dentro de la matriz polimérica. A continuación en la figura 4 se muestran los espectros FTIR.

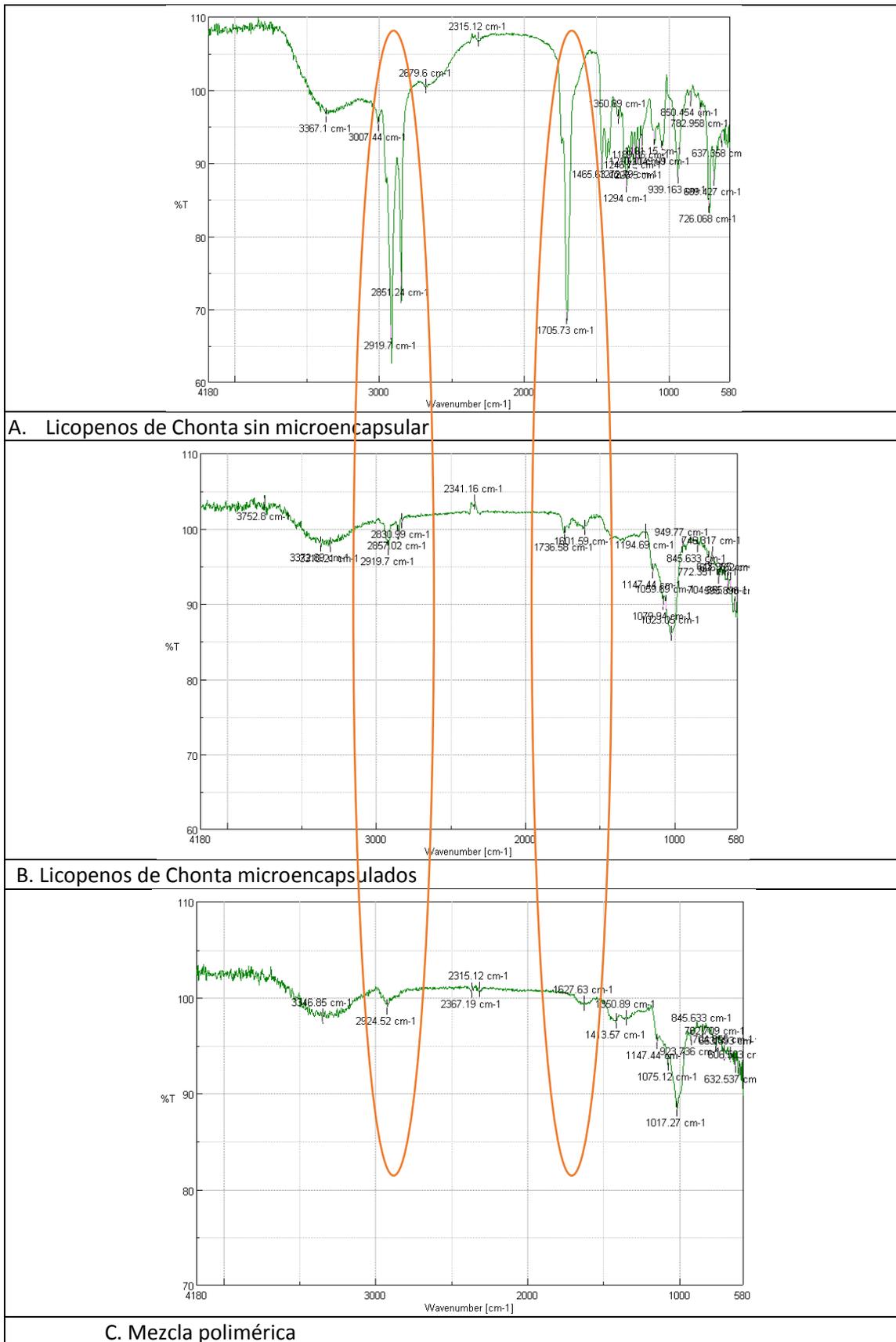


FIGURA 4. ESPECTRO INFRARROJO DE. A) CONCENTRADO DE CAROTENOIDES; B) CAROTENOIDES MICROENCAPSULADOS; C) MEZCLA POLIMÉRICA

En la figura 4.A se pudo observar los picos característicos que indican la presencia de la estructura de carotenoides en el extracto de chonta, se indican los picos más importantes a continuación:

3007,44 cm^{-1} es la bandas de los enlaces C-H con hibridación sp^2

2919,7 cm^{-1} y 2851,24 cm^{-1} son las bandas de los enlaces C-H con hibridación sp^3

1705,73 cm^{-1} banda de los dobles enlace de carbono C=C (esta banda esta corrida ya que debió estar en el rango de 1690 a 1630, esto pudo deberse a compuestos propios de la chonta que contaban con esta estructura y no se eliminaron en la extracción.)

1465,63 cm^{-1} banda de enlaces C-H₂

1101,15 cm^{-1} banda para enlaces C-H trans fuera del plano OOP

637,36 cm^{-1} banda del grupo funcional R₂C=CR (de igual manera está corrida porque debería estar en el rango mínimo de 615)

Además el espectro concuerda con el obtenido de Aghel & Ramezani, (2007), con picos en regiones similares, indicando que el extracto obtenido tuvo una gran cantidad de carotenoides en especial de licopeno.

En la fig. 4 B se observa que los picos de 2919,7 cm^{-1} , 2851,24 cm^{-1} y 1705,73 cm^{-1} se reducen indicando que la mezcla polimérica ha cubierto a las partículas de extracto, y se observó un pico en 1023,05 cm^{-1} correspondiente al grupo C-O, característico tanto de la maltodextrina como de la goma arábica, siendo otro indicador de que el microencapsulado presentaba en la superficie la mezcla polimérica y no el extracto.

En la fig. 4. C también se tuvo la ausencia de los picos del extracto y el pico en 1017,05 cm^{-1} , esto indicó que el microencapsulado tiene mayor similaridad a la mezcla polimérica que al extracto, siendo esto producto de la microencapsulación.

3.1.4. Análisis del punto de fusión por calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Se realizó un barrido de 17 minutos de las tres muestras para analizar su comportamiento mediante calorimetría, en el que se llegó hasta 200 °C, se tomó las siguientes medidas para el proceso:

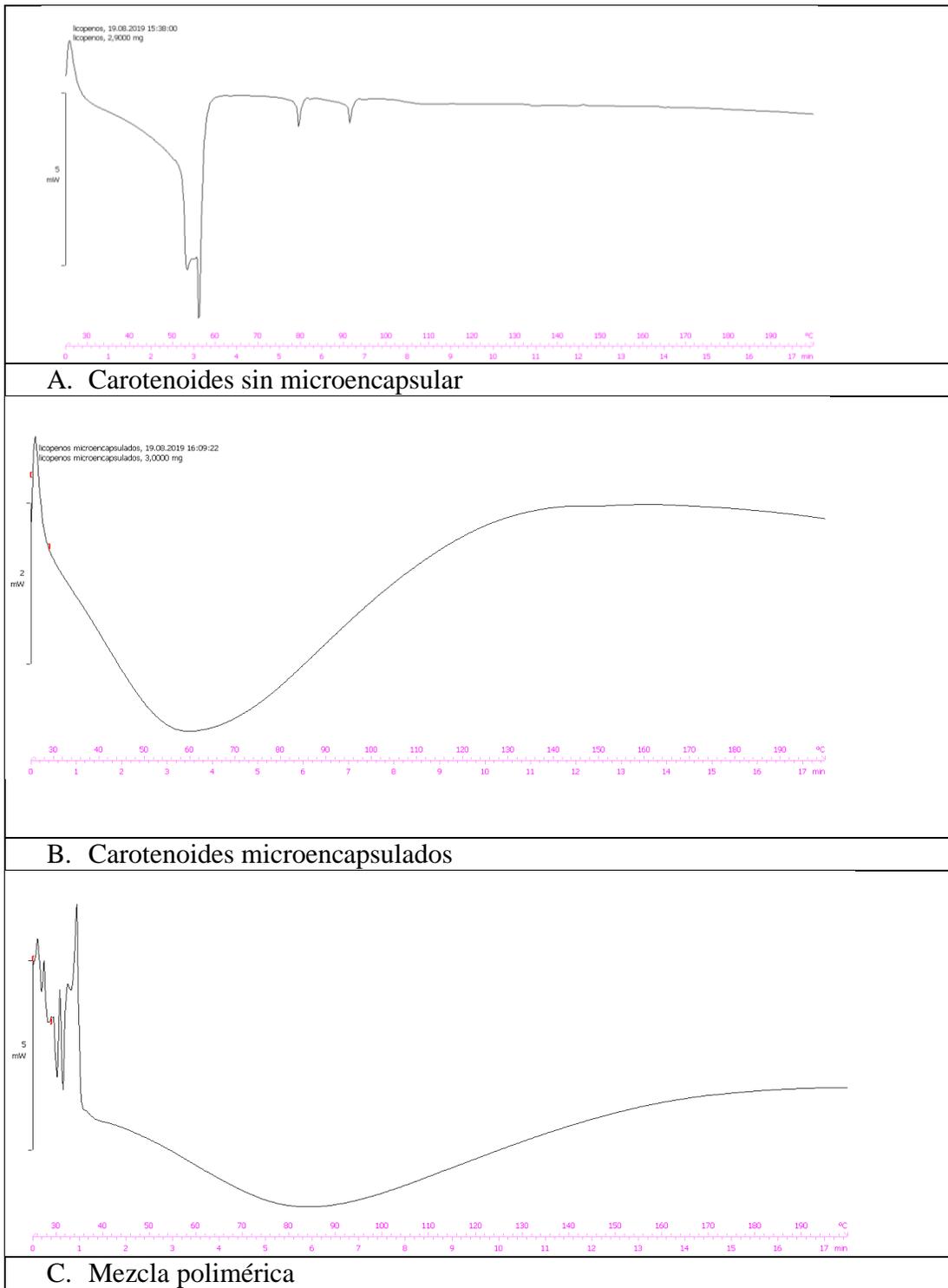


FIGURA 5. TERMOGRAMAS DE LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO DE. A) CONCENTRADO DE CAROTENOIDES; B) CAROTENOIDES MICROENCAPSULADOS; C) MEZCLA POLIMÉRICA

En la fig. 5. A se tiene un pico muy pronunciado en 55 °C aproximadamente, lo que indica la temperatura de fusión del licopeno, representante de los carotenoides, y en la

fig. 5. B esta queda oculta en una banda mucho más ancha que empieza casi al iniciar el barrido y continúa hasta los 135 °C.

En la fig. 5. C se tiene una interferencia al inicio pero esta da paso a la depresión que en este caso va hasta los 180 °C, indicando que es un comportamiento de la mezcla polimérica, y al ser similar al del microencapsulado se dice que el proceso de microencapsulación fue correcto ya que el pico de los carotenos no se presenta.

3.1.5. Actividad antioxidante *in vitro* del microencapsulado

El proceso de microencapsulación genera micropartículas con los carotenoides dentro de una matriz polimérica, esto con el beneficio de proteger a los metabolitos y así estos no pierdan su acción antioxidante por la luz, el oxígeno, la humedad o la temperatura, preservándola hasta el momento del consumo del producto.

El método más generalizado para analizar actividad antioxidante de un compuesto es la reacción con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), la estructura química de este compuesto capta los radicales libres que se encuentran en el ambiente, pero al estar en presencia de una antioxidante el átomo que se adjunta a la molécula de DPPH es un hidrógeno de parte del compuesto antioxidante y de esta manera se produce una reducción de la oxidación en la reacción general.

Se usaron patrones de trolox para realizar la curva de calibración y así poder generar una respuesta cuantitativa de la acción antioxidante del microencapsulado y del extracto, con interpolación se pudo obtener el porcentaje de inhibición y la concentración molar equivalente de trolox lo que permite compararlo con este antioxidante conocido.

En la siguiente figura se observa la regresión lineal de los patrones de calibración de concentración de trolox vs el porcentaje de inhibición que representan, obteniéndose una ecuación de recta que relaciona proporcionalmente estas magnitudes y serán usadas para calcular el porcentaje de inhibición del extracto y del microencapsulado.

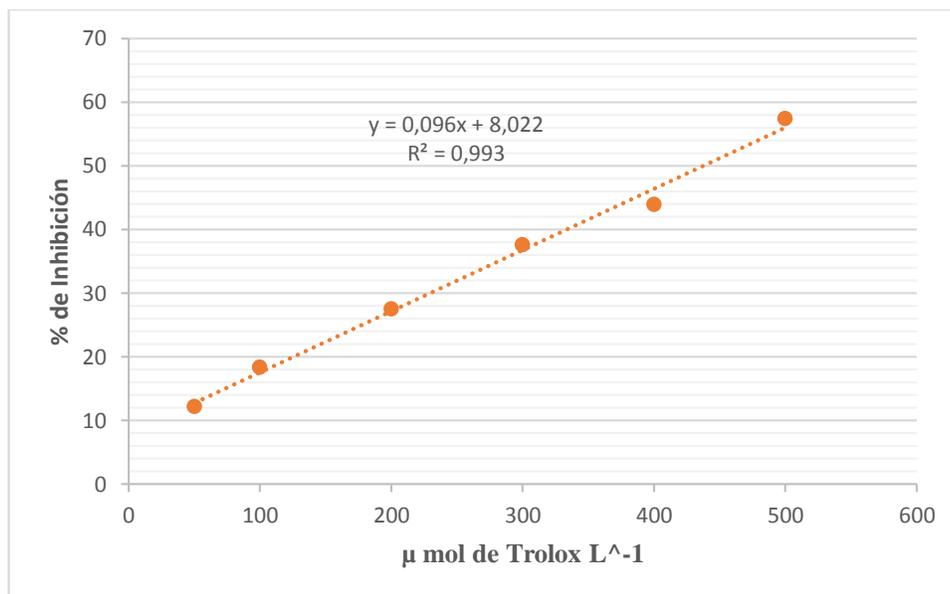


FIGURA 6. CURVA DE CALIBRACIÓN TROLOX

La regresión lineal dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,993, indicando que la relación entre los dos factores es fuerte y puede ser usada para interpolar valores dentro del rango abarcado, también indica que es una correlación positiva siendo que entre mayor concentración de trolox existe un mayor porcentaje de inhibición de la oxidación en una muestra.

Mediante la ecuación 6 se realizó la conversión de la absorbancia obtenida para determinar el porcentaje de inhibición por parte del microencapsulado y el extracto y gracias a la recta de regresión de la figura 6 se pudo calcular la concentración de trolox que será equivalente al porcentaje obtenido, siendo esta la medida que representa en estudios de capacidad antioxidante de un producto representados en la tabla 6, junto a los valores obtenidos de absorbancia luego del protocolo realizado.

TABLA 5. RESULTADOS DE INHIBICIÓN POR DPPH

Muestra	Dilución	Absorbancia	% de inhibición	μmol equivalentes de Trolox l ⁻¹
Extracto	1/200	0,452	14,67 %	69,19
Microencapsulado	1/200	0,498	13,71 %	59,30

Luego de obtener los valores por triplicado de las muestras del extracto y del microencapsulado y transformar la absorbancia a % de inhibición se pudo calcular la concentración equivalente de trolox, para ello se usó la curva $y = 0,096x + 8,022$ obtenida por los patrones de trolox, con un coeficiente de correlación de 0,993, datos de la figura 6

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

Los valores obtenidos en el análisis fueron de 14,67 % de inhibición para el extracto y 13,71 % para el microencapsulado en una dilución 1/200, indicando de esta manera que la actividad antioxidante no se ve reducida radicalmente por el proceso de microencapsulación, estos valores equivalen a 69,19 $\mu\text{mol/L}$ y 59,3 $\mu\text{mol/L}$ de trolox respectivamente.

3.1.6. Actividad antioxidante *in vivo* del microencapsulado

Se tienen dos figuras en las que se representan la respuesta de la levadura *S. cerevisiae* frente a peróxido de hidrógeno a 0,5 y 3 m mol/L debido a que este es un organismo modelo para investigación y se conoce sus condiciones de crecimiento, mientras el peróxido de hidrógeno es un estresante oxidativo para los microorganismos, mientras la vitamina C (usado como control) al igual que el microencapsulado fueron antioxidantes y protegieron a las células, los tratamientos que se aplicaron fueron:

En la figura 5

Levadura sin tratamiento

Levadura con 3mmol/L de peróxido

Levadura con 3mmol/L de peróxido y 25 mg/ml de vitamina C

Levadura con 3mmol/L de peróxido y 50 mg/ml de vitamina C

Levadura con 3mmol/L de peróxido y 25 mg/ml de microencapsulado

Levadura con 3mmol/L de peróxido y 50 mg/ml de microencapsulado

Y luego de los lavados detallados en el apartado 2.2.11 se mantuvo por 20 horas para observar su crecimiento frente a cada condición, este procedimiento se realizó por triplicado.

Los resultados de este experimento fueron representados en la siguiente figura, donde la absorbancia generada por cada muestra se midió cada 20 minutos, siendo este un indicador de la biomasa de levaduras generadas en cada pocillo, incrementándose cada hora hasta alcanzar la fase estacionaria, debido a los distintos tratamientos se obtuvo curvas distintas para cada uno, siendo aquellos que tenían protección de los microencapsulados los que tuvieron mayor crecimiento, mientras que los expuestos al peróxido directamente crecieron en menor proporción.

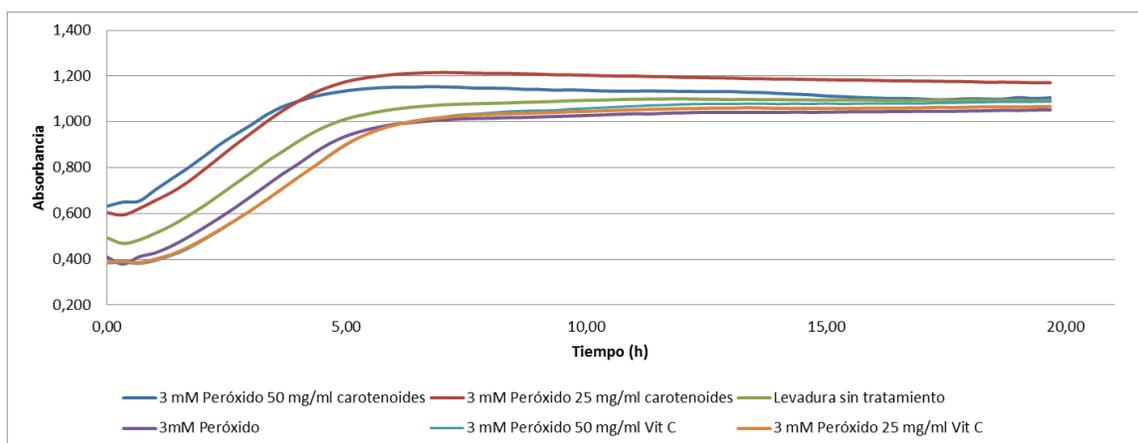


FIGURA 7. CURVA DE CRECIMIENTO DE *S. CEREVISIAE* FRENTE A UN ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR H_2O_2 3 $MMOLL^{-1}$.

En la figura 5 se observa que el mayor crecimiento se alcanza con los tratamientos con el microencapsulado tanto con 25 mg/ml como con 50 mg/ml, a pesar de estar expuestos al estrés oxidativo, esto se debió a los remanentes de la mezcla polimérica que no pudieron ser eliminados sirvieron como fuente de alimentos para que la levadura se desarrolle más que en los otros experimentos, luego le siguió la levadura sin tratamiento, la que se esperaba que tenga el mayor crecimiento.

Los tratamientos con 25 y 50 mg/ml de vitamina C fueron los que menor crecimiento tuvieron en las primeras 5 horas luego en las siguientes horas fue similar a la de peróxido sin tratamiento, a las 20 horas la concentración microbiana fue la siguiente:

1. Levadura con 3mmol/L de peróxido y 25 mg/ml de microencapsulado
2. Levadura con 3mmol/L de peróxido y 50 mg/ml de microencapsulado
3. Levadura sin tratamiento
4. Levadura con 3mmol/L de peróxido y 25 mg/ml de vitamina C
5. Levadura con 3mmol/L de peróxido y 50 mg/ml de vitamina C
6. Levadura con 3mmol/L de peróxido

El menor crecimiento de la levadura solo con el agente oxidante se debe a que no tiene ningún mecanismo de protección ante este agente estresante, reduciendo el crecimiento.

En la siguiente figura se muestran los tratamientos anteriores pero con la variación de la concentración de peróxido de hidrógeno bajándola hasta 0,5 mmol/l, siendo esto realizado para identificar el comportamiento ante un menor estrés, obteniéndose claras diferencias en especial en los tratamientos con 50 mg/ml tanto de microencapsulado como de vitamina C.

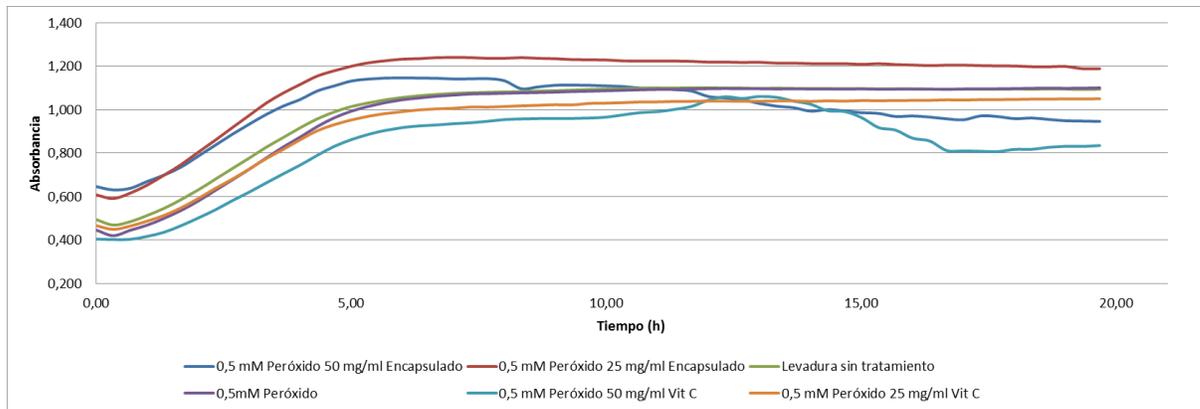


FIGURA 8. CURVA DE CRECIMIENTO DE *S. CEREVISIAE* FRENTE A UN ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR H_2O_2 3 $MMOLL^{-1}$ Y PROTECCIÓN CON VITAMINA C Y EL MICROENCAPSULADO DE CAROTENOIDES DE CHONTA

En estos tratamientos se observó que a partir de las 7 horas la concentración de 50 mg/ml tanto de microencapsulado como de vitamina C el crecimiento disminuyó y no siguió una tendencia estable, debido a un efecto antimicrobiano de los antioxidantes frente a la levadura debido a una alta concentración de estos compuestos.

En esta concentración de peróxido se observa que al final de las 20 horas la bacteria se ha logrado acoplar al oxidante y tener un crecimiento normal, con lo visto en las curvas de 0,5 mmol/L de peróxido y de levadura sin tratamiento, que al inicio fue superior la que no

tuvo tratamiento pero a las 20 horas la densidad microbiana fue prácticamente la misma.

El crecimiento mayor que se obtuvo fue en el tratamiento con 0,5mmol/L de peróxido y 25mg/ml de microencapsulado, similar al tratamiento con 3mmol/L de peróxido, los compuestos de la matriz polimérica promueven este crecimiento superior al natural.

Mientras que el tratamiento con 25 mg/ml de vitamina C fue menor al de la curva sin tratamiento debido a que la protección ante el peróxido no se da desde el instante de inoculación sino requiere que las levaduras se acoplen a las nuevas condiciones con la consecuente disminución de la curva de crecimiento.

El microencapsulado tiene propiedad antioxidante que previene que un agente como el peróxido de hidrógeno evite el crecimiento de *S. cerevisiae*, además la acción de los polímeros permite obtener un crecimiento aún mayor al de la levadura sola, se tiene también que una alta concentración de antioxidantes puede ser contraproducente para las células si estas no están bajo ningún estrés o este es poco potente, por lo que se requiere un estudio más amplio sobre el efecto de la matriz polimérica y la concentración de antioxidantes en el crecimiento de *S. cerevisiae*.

3.1.7. Comprobación de la hipótesis

Luego de los diferentes análisis realizados y al haber aplicado los procedimientos principales de evaluación de actividad antioxidante se decidieron:

$H_0 \neq 0$ Rechazar la hipótesis nula

$H_a = 0$ Aceptar la hipótesis alternativa con la afirmación de que el procedimiento de microencapsulación si tuvo influencia en la actividad antioxidante.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se determinó que las condiciones óptimas para extracción de carotenoides a partir de *Bactris gasipae* (chonta) fueron una madurez del 100 %, una relación material vegetal y etanol de 1 en 70 partes, usando etanol al 96 %, por un tiempo de 60 minutos de extracción.
- En el proceso de microencapsulación se alcanzó una eficiencia del 98,90 %, lo cual fue corroborado a través de la comparación de los espectros de FTIR y los termogramas de la DSC.
- Se evaluó la actividad antioxidante de los productos obteniendo 69,19 $\mu\text{mol/L}$ del extracto y 59,30 $\mu\text{mol/L}$ del microencapsulado equivalentes de Trolox en la evaluación *in vitro* mientras que en la evaluación *in vivo* dio como resultado que en los tratamientos con el microencapsulado se alcanzó un mayor crecimiento que aquellas sometidas al estrés y la que no tuvo ningún tratamiento.

4.2. Recomendaciones

- Evaluar el microencapsulado obtenido como ingrediente de alimentos y suplementos.
- Comparar el proceso de extracción con el uso de otros métodos de extracción no convencionales como la extracción con fluidos supercríticos para comparar la eficiencia de los métodos.
- Estudiar el efecto antimicrobiano de altas concentraciones de antioxidantes en cepas que no estén sometidas a estrés o un estrés muy bajo.
- Evaluar el efecto de otras matrices poliméricas sobre el crecimiento de la levadura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghel, N., & Ramezani, Z. (2007). Isolation and Quantification of Lycopene from Tomato Cultivated in Dezfoul, Iran. *Jundishapur Journal Of Natural Pharmaceutical Products*, 6(1), 9-15.
- Ahmed, B., Yusuf, m., Khan, M., & Khan, R. (2012). Plausible antioxidant biomechanics and anticonvulsant pharmacological activity of brain-targeted β -carotene nanoparticles. *International Journal Of Nanomedicine*, 7(1), 4311. <https://doi.org/10.2147/ijn.s34588>
- Álvarez, J. (2020). *Guía para la Recolección de Material Vegetal* (pp. 45-46). Boyacá: SENA.
- Aslan, r. (2018). Antioxidant Safety and Antioxidant-induced Stress. *Kocatepe Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.30607/kvj.447022>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 2(494), 161-172. <https://doi.org/10.4067/s0718-04622006000200010>
- Avendaño Prieto, G., & Acevedo Buitrago, B. (2015). Proceso de microencapsulación de colorantes naturales presentes en la fresa (*Fragaria vesca*). *Revista Ontare*, 2(2), 7. <https://doi.org/10.21158/23823399.v2.n2.2014.1239>
- Bendala-Tufanisco, E., & Grisolia, S. (2007). Tratamiento con antioxidantes. *Archivos De La Sociedad Española De Oftalmología*, 82(11). <https://doi.org/10.4321/s0365-66912007001100004>
- Boveris, A. (2002). Radicales libres y antioxidantes en salud humana. *Medwave*, 2(7). <https://doi.org/10.5867/medwave.2002.07.3608>
- Bringas-Lantigua, M., Valdés, D., & Pino, J. (2012). Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated lime essential oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(7), 1511-1517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02999.x>
- Calderón, S., & Vera, E. (2018). *Extracción de Carotenos de Cáscara de Mango*

- (*Mangifera indica*) con mezclas de Solventes y Extracción Asistida. Revista Bionatura.
- Camps, D., & Ruffino, S. (2010). *Bioquímica del estrés oxidativo* (3rd ed., p. 40). Lulu.
- Cardona, E., Ríos, L., & Restrepo, G. (2006). Extracción Del Carotenoide Licopeno Del Tomate Chonto (*Lycopersicum esculentum*). *Vitae*, 13(2).
- Carranco, M., Calvo, M., & Pérez, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, 61(3).
- Cerqueira, F., Medeiros, M., & Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controversias e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), 441-449. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000200036>
- Clavijo, J., & Yanez, P. (2017). Plantas frecuentemente utilizadas en zonas rurales de la Región Amazónica centro occidental de Ecuador. *INNOVA Research Journal*, 2(6), 9-21. <https://doi.org/10.33890/innova.v2.n6.2017.180>
- Coronado H, M., Vega y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M., & Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena De Nutrición*, 42(2), 206-212. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182015000200014>
- Coronado H, M., Vega y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M., & Radilla V, C. (2015). *Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana*. Scielo. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>.
- Cruz Neyra, L. (2018). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Biotempo*, 3(4), 27-29. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v3i0.1522>
- Davies, P. (2015). La conservación mediante el secado. In *Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas* (5th ed., pp. 201-2013). INIA.
- Fiallos, H. (2019). *Extracción y microencapsulación, de carotenoides con actividad antioxidante a partir de Daucus carota*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Finch, C., & Bodmeier, R. (2000). Microencapsulation. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 14(3), 25-26. https://doi.org/10.1002/14356007.a16_575
- FTIR Spectroscopy. (2016), 5(1), 294-296. <https://doi.org/10.21275/v5i1.nov152444>

- Gallegos Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales De La Facultad De Medicina*, 77(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- González-Mangado, N., & Morera Prat, J. (2001). Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *Archivos De Bronconeumología*, 37(10), 407-409. [https://doi.org/10.1016/s0300-2896\(01\)75109-5](https://doi.org/10.1016/s0300-2896(01)75109-5)
- Guevara, J. (2020). *Extracción y microencapsulado de carotenoides con actividad antioxidante a partir de Pouteria sapota*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Inec. (2016). *Cifras de biodiversidad en Ecuador* (pp. 4-5). Quito: INEC.
- Johnson, D. (2007). *The role of palms in future tropical production systems and strategic palm species for human nutrition* (pp. 15-16). Cali: CIPAV.
- Juscamaita Fabián, L., Pérez Salvatierra, T., Espinoza Silva, C., Quispe Solano, M., Hinostroza Quiñónez, G., Flores Ramos, O., & Manyari Cervantes, G. (2017). Evaluación de la estabilidad de carotenoides y actividad antioxidante de la flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) en la microencapsulación por Spray-Drying. *Revista De La Sociedad Química Del Perú*, 83(3), 282-293. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v83i3.112>
- López, O., & Gómez, M. (2008). Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Cubana Farm*, 42(3).
- Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante, J., Rocha-Guzmán, N., Moreno-Jiménez, M., Medina-Torres, L., & González-Laredo, R. (2019). Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 19(2), 491-521. <https://doi.org/10.24275/rmiq/alim642>
- Martínez Girón, J., Ordoñez Santos, L., & Rodríguez-Rodríguez, D. (2019). Extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) peel by means of ultrasound application and vegetable oil. *DYNA*, 86(209), 91-96. <https://doi.org/10.15446/dyna.v86n209.74840>
- Martínez, A. (2011). *Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites y de su fracción insaponificable de los frutos: Mauritia flexuosa (Morete), Bactris gasipae*

(chonta), *Plukenetia volubilis* (*Sacha inchi*), y *Oneocarpus batahua* (*Ungurahua*), utilizando los métodos *dpph* y *test del b-caroteno* (p. 7). Quito: UPS.

Mate Jiménez, C., & Oriol Hoyos, N. (2011). *Curso general sobre Statgraphics* (4th ed.). Universidad Pontificia Comillas.

Mattivi, F. (2002). Antioxidantes polifenólicos naturales de la dieta. *Medwave*, 2(10).
<https://doi.org/10.5867/medwave.2002.10.3322>

Mayor, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *The Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 5(2), 23-29.

Melendez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, 54(2), 209-215.

Milardovic, S., Iveković, D., Rumenjak, V., & Grabarić, B. (2005). Use of DPPH·|DPPH Redox Couple for Biamperometric Determination of Antioxidant Activity. *Electroanalysis*, 17(20), 1847-1853.
<https://doi.org/10.1002/elan.200503312>

Mondragón, R., Julia, J., Barba, A., & Jarque, J. (2013). El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*, 52(4), 159-168.
<https://doi.org/10.3989/cyv.212013>

Mora-Urpí, J., Weber, J., & Clement, C. (2004). *Peach palm* (4th ed., pp. 27-28). IPGRI.

Pastuña-Pullutasig, A., López-Hernández, O., Debut, A., Vaca, A., Rodríguez-Leyes, E., & Vicente, R. et al. (2016). Microencapsulación de aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante secado por aspersion. *Revista Colombiana De Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 422-437.
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62029>

Pérez, C. (2019). *Extracción y microencapsulación de licopenos provenientes de residuos agroindustriales del tomate de árbol (Solanum betaceum)* (p. 30). Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

Pires, M., Amante, E., Lopes, A., Rodrigues, A., & Silva, L. (2019). Peach palm flour

- (*Bactris gasipae* KUNTH): potential application in the food industry. *Food Science and Technology*, 39(3), 613-619. <https://doi.org/10.1590/fst.34617>
- Primo Yúfera, E. (2007). *Química orgánica básica y aplicada* (4th ed.). Reverté.
- Radomski, R. (2013). Determination of organic phase diagrams by the DSC method. *Journal of Crystal Growth*, 65(1-3), 509-510. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(83\)90094-5](https://doi.org/10.1016/0022-0248(83)90094-5)
- Rodríguez Rivera, V., & Simón Magro, E. (2008). *Bases de la alimentación humana* (3rd ed., pp. 49-50). Netbiblo.
- Roeland, R. (2003). *Palmito (Bactris gasipaes H.B.K.) Cultivation in the Atlantic and Northern zone of Costa Rica* (2nd ed., p. 6). CATIE.
- Segovia, J. (2015). *Obtención de una bebida saborizada a partir de chontaduro (Bactris gasipaes H.B.K.)*. Quito: EPN.
- Viada, E., Gómez, L., & Reyna, I. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*, 1(21). Recuperado 9 Abril 2020, desde http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014.
- Zarin, D. (2004). *Working forests in the neotropics* (1st ed., p. 45). Columbia University Press.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la absorbancia de la extracción de carotenoides

	90% madurez		100% madurez	
	30 min	60 min	30 min	60 min
1:70	0,075	0,097	0,247	0,251
1:70	0,093	0,098	0,252	0,249
1:70	0,089	0,11	0,247	0,242
1:80	0,077	0,088	0,209	0,206
1:80	0,085	0,085	0,198	0,217
1:80	0,09	0,085	0,213	0,216

Anexo 2. Resultados de la eficiencia de extracción del diseño experimental

Absorbancia				
	90% madurez		100% madurez	
	30 min	60 min	30 min	60 min
1:70	0,086	0,102	0,249	0,247
1:80	0,084	0,086	0,207	0,213
Volumen final (ml)				
	90% madurez		100% madurez	
	30 min	60 min	30 min	60 min
1:70	47	45	48	43
1:80	48	45	45	46
Concentración (mg/l)				
	90% madurez		100% madurez	
	30 min	60 min	30 min	60 min
1:70	2,483	2,947	7,208	7,169
1:80	2,435	2,493	5,990	6,174
Eficiencia (g/g)				
	90% madurez		100% madurez	
	30 min	60 min	30 min	60 min
1:70	0,00016	0,00019	0,00049	0,00043
1:80	0,00019	0,00018	0,00043	0,00045

Anexo 3. Porcentaje de humedad de los extractos

	90% madurez		100% madurez	
	30 min	60 min	30 min	60 min
1:70	99,417	99,345	99,353	99,192
1:70	99,530	99,442	99,333	99,183
1:70	99,422	99,352	99,409	99,210
1:80	99,231	99,243	99,202	99,121
1:80	99,333	99,216	99,189	99,200
1:80	99,252	99,275	99,205	99,115

Anexo 4. Porcentaje de sólidos totales en los extractos

	90% madurez		100% madurez	
	30 min	60 min	30 min	60 min
1:70	0,583	0,655	0,647	0,808
1:70	0,47	0,558	0,667	0,817
1:70	0,578	0,648	0,591	0,79
1:80	0,769	0,757	0,798	0,879
1:80	0,667	0,784	0,811	0,8
1:80	0,748	0,725	0,795	0,885

Anexo 5. Resultados de la absorbancia del crecimiento de las levaduras en el análisis *in vivo* 0,5 mmol/l

Tiempo (h)	Absorbancia					
	50 mg/ml Encapsulado	25 mg/ml Encapsulado	Levadura sin tratamiento	Peróxido	50 mg/ml Vit C	25 mg/ml Vit C
0,00	0,646	0,608	0,494	0,446	0,404	0,466
0,33	0,631	0,591	0,469	0,420	0,402	0,449
0,67	0,638	0,616	0,484	0,445	0,403	0,464
1,00	0,669	0,653	0,513	0,468	0,417	0,487
1,33	0,699	0,699	0,546	0,500	0,436	0,513
1,67	0,736	0,748	0,586	0,536	0,466	0,549
2,00	0,786	0,804	0,631	0,579	0,501	0,591
2,33	0,836	0,859	0,679	0,628	0,539	0,637
2,67	0,886	0,917	0,729	0,676	0,581	0,680
3,00	0,933	0,974	0,777	0,726	0,621	0,727

3,33	0,978	1,030	0,827	0,778	0,663	0,775
3,67	1,016	1,076	0,872	0,828	0,705	0,817
4,00	1,047	1,116	0,917	0,874	0,745	0,861
4,33	1,086	1,154	0,957	0,922	0,790	0,903
4,67	1,109	1,179	0,989	0,962	0,831	0,931
5,00	1,131	1,199	1,014	0,993	0,862	0,952
5,33	1,140	1,215	1,031	1,015	0,886	0,969
5,67	1,145	1,225	1,045	1,032	0,904	0,982
6,00	1,146	1,232	1,056	1,045	0,917	0,991
6,33	1,145	1,234	1,064	1,054	0,925	0,999
6,67	1,144	1,239	1,070	1,061	0,929	1,003
7,00	1,141	1,240	1,075	1,067	0,935	1,006
7,33	1,141	1,239	1,077	1,072	0,939	1,012
7,67	1,142	1,236	1,079	1,073	0,946	1,011
8,00	1,133	1,236	1,081	1,075	0,954	1,014
8,33	1,096	1,239	1,083	1,077	0,957	1,017
8,67	1,105	1,236	1,085	1,078	0,959	1,020
9,00	1,112	1,234	1,087	1,080	0,959	1,022
9,33	1,113	1,230	1,089	1,083	0,959	1,022
9,67	1,112	1,229	1,092	1,084	0,961	1,029
10,00	1,109	1,228	1,094	1,087	0,965	1,030
10,33	1,106	1,224	1,095	1,089	0,976	1,032
10,67	1,099	1,224	1,098	1,091	0,986	1,035
11,00	1,099	1,223	1,099	1,093	0,990	1,035
11,33	1,092	1,223	1,100	1,093	1,001	1,038
11,67	1,085	1,222	1,100	1,094	1,015	1,038
12,00	1,060	1,218	1,101	1,096	1,043	1,039
12,33	1,054	1,219	1,099	1,097	1,059	1,039
12,67	1,045	1,217	1,099	1,096	1,051	1,038
13,00	1,028	1,218	1,097	1,096	1,060	1,038
13,33	1,016	1,214	1,099	1,095	1,056	1,040
13,67	1,009	1,214	1,097	1,095	1,039	1,040
14,00	0,993	1,211	1,097	1,095	1,025	1,038
14,33	1,000	1,211	1,097	1,095	0,995	1,040
14,67	0,994	1,211	1,096	1,094	0,991	1,039
15,00	0,986	1,208	1,096	1,095	0,963	1,041
15,33	0,982	1,211	1,095	1,094	0,917	1,041
15,67	0,968	1,207	1,095	1,094	0,905	1,041
16,00	0,971	1,205	1,095	1,095	0,868	1,042
16,33	0,966	1,202	1,094	1,094	0,856	1,043
16,67	0,958	1,204	1,093	1,093	0,812	1,045
17,00	0,953	1,204	1,094	1,095	0,810	1,044
17,33	0,971	1,202	1,094	1,095	0,808	1,046
17,67	0,968	1,201	1,093	1,096	0,807	1,046
18,00	0,958	1,200	1,094	1,097	0,817	1,047
18,33	0,961	1,197	1,094	1,098	0,817	1,048
18,67	0,955	1,197	1,095	1,099	0,827	1,048
19,00	0,949	1,198	1,094	1,098	0,831	1,049
19,33	0,947	1,188	1,092	1,099	0,831	1,049
19,67	0,946	1,188	1,094	1,100	0,835	1,050

Anexo 6. Resultados de la absorbancia del crecimiento de las levaduras en el análisis in vivo 3 mmol/l

Tiempo (h)	Absorbancia					
	50 mg/ml Encapsulado	25 mg/ml Encapsulado	Levadura sin tratamiento	Peróxido	50 mg/ml Vit C	25 mg/ml Vit C
0,00	0,632	0,604	0,494	0,410	0,382	0,389
0,33	0,650	0,594	0,469	0,379	0,386	0,392
0,67	0,654	0,621	0,484	0,411	0,380	0,386
1,00	0,702	0,656	0,513	0,428	0,393	0,401
1,33	0,750	0,691	0,546	0,457	0,415	0,420
1,67	0,796	0,735	0,586	0,494	0,443	0,450
2,00	0,846	0,788	0,631	0,535	0,482	0,487
2,33	0,899	0,843	0,679	0,579	0,523	0,527
2,67	0,944	0,898	0,729	0,625	0,568	0,570
3,00	0,986	0,950	0,777	0,674	0,613	0,614
3,33	1,032	1,002	0,827	0,724	0,660	0,661
3,67	1,067	1,050	0,872	0,774	0,709	0,711
4,00	1,091	1,092	0,917	0,818	0,759	0,760
4,33	1,112	1,128	0,957	0,867	0,807	0,808
4,67	1,125	1,155	0,989	0,908	0,855	0,858
5,00	1,136	1,177	1,014	0,939	0,901	0,904
5,33	1,144	1,190	1,031	0,961	0,938	0,939
5,67	1,149	1,200	1,045	0,977	0,966	0,966
6,00	1,152	1,208	1,056	0,990	0,986	0,986
6,33	1,151	1,212	1,064	0,997	1,003	1,001
6,67	1,154	1,214	1,070	1,004	1,014	1,012
7,00	1,153	1,216	1,075	1,008	1,022	1,018
7,33	1,151	1,215	1,077	1,013	1,031	1,026
7,67	1,148	1,212	1,079	1,015	1,035	1,031
8,00	1,147	1,212	1,081	1,016	1,040	1,033
8,33	1,146	1,212	1,083	1,018	1,045	1,035
8,67	1,143	1,210	1,085	1,019	1,048	1,037
9,00	1,142	1,208	1,087	1,022	1,050	1,040
9,33	1,139	1,206	1,089	1,024	1,051	1,041
9,67	1,140	1,205	1,092	1,026	1,056	1,045
10,00	1,138	1,204	1,094	1,028	1,059	1,046
10,33	1,135	1,201	1,095	1,030	1,062	1,048
10,67	1,134	1,200	1,098	1,033	1,066	1,051
11,00	1,134	1,200	1,099	1,035	1,069	1,053
11,33	1,135	1,198	1,100	1,035	1,072	1,055
11,67	1,134	1,197	1,100	1,038	1,074	1,056
12,00	1,134	1,194	1,101	1,039	1,077	1,058
12,33	1,133	1,194	1,099	1,041	1,078	1,059
12,67	1,132	1,192	1,099	1,041	1,079	1,060
13,00	1,133	1,192	1,097	1,042	1,079	1,060
13,33	1,129	1,189	1,099	1,041	1,079	1,062
13,67	1,128	1,189	1,097	1,042	1,080	1,061
14,00	1,124	1,187	1,097	1,041	1,078	1,059
14,33	1,121	1,187	1,097	1,043	1,080	1,059

14,67	1,118	1,185	1,096	1,042	1,078	1,059
15,00	1,113	1,184	1,096	1,042	1,080	1,060
15,33	1,110	1,183	1,095	1,044	1,079	1,059
15,67	1,107	1,183	1,095	1,044	1,080	1,060
16,00	1,104	1,181	1,095	1,044	1,081	1,061
16,33	1,102	1,180	1,094	1,045	1,081	1,060
16,67	1,102	1,179	1,093	1,045	1,081	1,061
17,00	1,100	1,178	1,094	1,047	1,080	1,062
17,33	1,097	1,177	1,094	1,046	1,083	1,064
17,67	1,098	1,176	1,093	1,046	1,083	1,063
18,00	1,101	1,176	1,094	1,048	1,085	1,064
18,33	1,100	1,173	1,094	1,049	1,086	1,066
18,67	1,099	1,174	1,095	1,051	1,088	1,066
19,00	1,106	1,173	1,094	1,050	1,087	1,066
19,33	1,102	1,171	1,092	1,052	1,088	1,066
19,67	1,105	1,171	1,094	1,053	1,089	1,067

Anexo 7. Chonta con 100% de madurez



Anexo 8. Trozos de chonta para secado



Anexo 9. Secado de los trozos de chonta para triturado



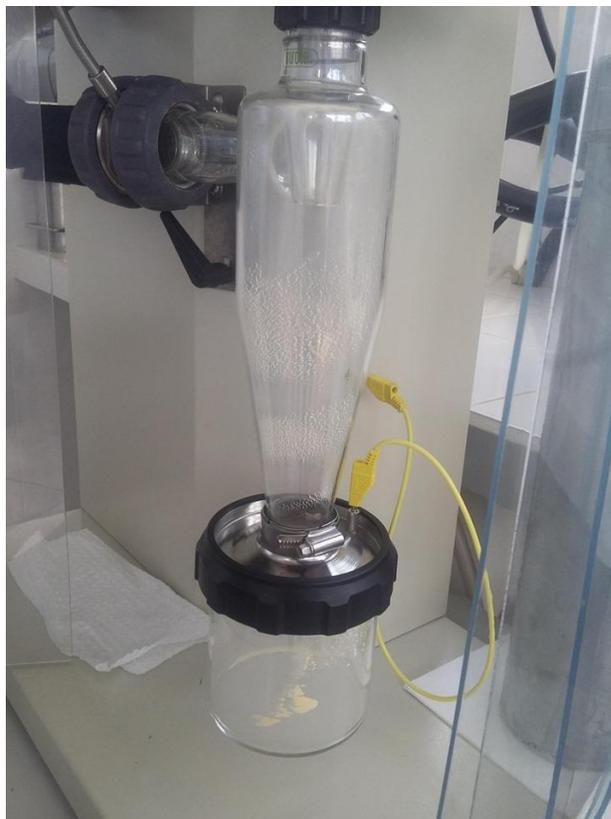
Anexo 10. Extractos de chonta



Anexo 11. Proceso de microencapsulación



Anexo 12. Microencapsulado obtenido



Anexo 13. Análisis *in vivo*

